

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií

Studijní program: N 3901 – Aplikované vědy v inženýrství

Studijní obor: 3901T025 – Přírodovědné inženýrství

Vývoj metod pro detekci vlivu elementárního nanoželeza na růst sinic a řas

Development of methods for detection of the effect of elementary nanoiron on the growth of cyanobacteria and algae

Diplomová práce

| | |
|--------------------------|---------------------------|
| Autor: | Bc. Kateřina Šimonová |
| Vedoucí diplomové práce: | Ing. Lenka Lacinová |
| Konzultant: | RNDr. Alena Ševců, Ph. D. |

V Liberci 20.5.2011

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím diplomové práce a konzultantem.

Datum: 20.5.2011

Podpis:

Poděkování

Velice ráda bych poděkovala všem, kteří se podíleli na vzniku této práce.

V první řadě bych chtěla poděkovat vedoucí své diplomové práce Ing. Lence Lacinové za vedení a rady týkající se nulmocného nanoželeza. Dále bych chtěla poděkovat svému konzultantovi RNDr. Aleně Ševců Ph. D. za pomoc při laboratorních testech a za rady týkající se používaných mikroorganismů. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Kláře Řehákové Ph. D. a Marii Kupkové z Hydrobiologického ústavu AVČR za poskytnutý biologický materiál a rady při kultivaci mikroorganismů.

Poděkování patří Ing. Tomáši Pluhařovi za technickou podporu a za vyrobení kultivačního boxu. Ing. Bc. Štěpánce Klímkové za pomoc v laboratoři při dispergování suspenze nulmocného nanoželeza a za rady s modifikačními látkami a Ing. Lucii Křiklavové za počáteční pomoc při mikroskopování. Bc. Lucii Cádrové patří můj dík za pomoc při analyzování nanočástic železa, zejména při měření na přístroji Zetasizer Nano ZS a za pomoc při jazykových korekturách tohoto textu.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Nikole Jurčkové ze společnosti Roche za zapůjčení přístroje Casy model TT a za instruktáž k tomuto přístroji a Ing. Rudolfovi Krentíkovi za zapůjčení fluorescenčního mikroskopu Zeiss Axio Imager A1.

Abstrakt

Cílem této práce bylo modifikovat dostupné metody pro analýzu růstu a životaschopnosti mikroorganismů pro účely testování vlivu nulmocného nanoželeza sinice a řasy. Experimenty byly prováděny na běžných zástupcích sinic a řas izolovaných z Lipenské přehrady (*Chlamydomonas*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*). Na těchto fotosyntetizujících mikroorganismech byl studován vliv nemodifikovaných nanočástic nulmocného železa, vliv nanočástic modifikovaných pomocí soli polyakrylové kyseliny a vliv prototypu nulmocného železa μZVI .

Vliv nanoželeza byl analyzován pomocí dvou setů zjišťujících cytotoxicitu a množství reaktivních forem kyslíku (ROS) a přístroje analyzujícího životaschopnost buněčné kultury. Při jednotlivých experimentech byly optimalizovány metody inkubace buněčných kultur a provedení testů. Bylo zjištěno, že při inkubaci je nutné zajistit kontinuální kontakt nanoželeza s mikroorganismy. Při zjišťování vlivu nulmocného nanoželeza na sinice a řasy pomocí cytotoxického testu je zapotřebí dostatečná hustota buněk ve vzorcích. Pomocí této metody není možné analyzovat vliv modifikovaných typů nanoželeza, protože modifikační látky způsobují zabarvení vzorků a to může vést k chybné interpretaci výsledků z měření absorbance.

Přístroj vyhodnocující životaschopnost buněčné kultury pomocí velikosti jednotlivých buněk, využívá k měření elektrický proud, který prochází buněčnou membránou mrtvých buněk, ale neprochází membránou živých buněk. Tímto přístrojem lze zjišťovat vliv modifikovaného i nemodifikovaného nulmocného nanoželeza na eukaryotické organismy. Poslední metodou byly analyzovány ROS generované v buňkách mikroorganismů a způsobující oxidační stres. ROS byly detekovány pomocí fluorescenční látky. Touto metodou je možné analyzovat vliv modifikovaného i nemodifikovaného nanoželeza na sinice i řasy.

Kromě modifikace metod bylo při provádění experimentů mimo jiné zjištěno, že nemodifikované nanoželezo má na řasu *Chlamydomonas* sp. i sinice *Anabaena* planktonica a *Aphanizomenon flos-aquae* srovnatelný účinek. Dále pak, že nejvíce toxické pro řasu *Chlamydomonas* sp. bylo modifikované nulmocné nanoželezo, které v koncentraci pouze 250 mg/l způsobilo úmrtí 70 % buněk v populaci.

Klíčová slova: nulmocné nanoželezo, sinice, řasy, ROS

Abstract

The aim of this study was to improve available methods for the analysis of growth and viability of microorganisms, for the purposes of testing the effect of zerovalent nanoiron on cyanobacteria and algae. Experiments were conducted on common representatives of cyanobacteria and algae isolated from Lake Lipno (*Chlamydomonas*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*). On these photosynthetic microorganisms we studied the influence of unmodified zerovalent iron nanoparticles, the influence of nanoparticle modified with salts of polyacrylic acid, and the effect of the prototype zerovalent iron μ ZVI.

Influence of nanoiron was analyzed with two sets which determined the cytotoxicity and quantity of reactive oxygen species (ROS), and the equipment for analysis of cell cultures viability. The methods of cell cultures incubation and testing itself were optimized with individual experiments. We found out that it is necessary to provide continuous contact between microorganisms and nanoiron during the incubation period. For the study of the impact of nanoiron on the cyanobacteria and algae by cytotoxic tests, sufficient density of cells in the samples is required. With this method we cannot analyze the effect of modified types of nanoiron because modifying agents cause discoloration of samples which leads to misinterpretation of absorbancy results.

The instrument used for evaluation of cell cultures viability by different cell sizes uses electric current for measurement. The electric current passes through the cell membrane of dead cells, but not through the membrane of living cells. This device can detect the effect of modified and unmodified zerovalent nanoiron on eukaryotic organisms. The last method used was the analysis of ROS which is generated in cells and organisms that cause oxidative stress. ROS were detected using fluorescent substance. This method can analyze the effect of modified and unmodified nanoiron of cyanobacteria and algae.

In addition to improving the methods of conducting experiments we also found that the unmodified nanoiron has a similar effect on algae *Chlamydomonas* sp. the cyanobacteria *Anabaena planktonica* and *Aphanizomenon flos-aquae*. Furthermore, the most toxic to algae *Chlamydomonas* sp. was found to be the modified nanoiron, which at a concentration of only 250 mg/l caused 70 % of the cell population dead.

Key words: zerovalent nanoiron, cyanobacteria, algae, ROS

Obsah

| | |
|--|----|
| Zadání práce | 2 |
| Prohlášení | 3 |
| Poděkování | 4 |
| Abstrakt | 5 |
| The Abstract | 6 |
| Obsah | 7 |
| Seznam použitých zkratk | 12 |
| Úvod | 13 |
| 1 Mikroskopické sinice a řasy | 14 |
| 1.1 Sinice (Cyanobacteria) | 14 |
| 1.1.1 Anabaena planktonica | 15 |
| 1.1.2 Aphanizomenon flos-aquae | 15 |
| 1.2 Zelené řasy (Chlorophyta) | 16 |
| 1.2.1 Chlamydomonas sp. | 16 |
| 1.3 Vodní květ | 17 |
| 1.3.1 Způsoby odstraňování vodního květu | 19 |
| 2 Nanoželezo | 22 |
| 2.1 Syntéza nulmocného železa | 22 |
| 2.2 Reakce nanoželeza | 25 |
| 2.3 Technická data nanoželeza Nanofer a prototypu μ ZVI | 25 |
| 3 Vliv nulmocného nanoželeza na sinice a řasy | 29 |
| 4 Praktická část | 34 |
| 4.1 Cíle praktické části | 34 |
| 4.2 Použité materiály | 34 |
| 4.3 Příprava suspenze nanoželeza | 35 |
| 4.4 Testování nanoželeza | 36 |
| 4.4.1 Určení podílu nulmocného a celkového železa v suspenzi | 36 |
| 4.4.2 Měření velikosti částic nanoželeza | 38 |
| 4.5 Kultivace mikroorganismů | 40 |
| 4.6 Metody zjišťování vlivu nanoželeza na sinice a řasy | 43 |
| 4.6.1 Zjišťování stavu kultury optickým mikroskopem | 44 |

| | | |
|---|---|----|
| 4.6.2 | Zjišťování toxicity nanoželeza cytotoxickým testem | 44 |
| 4.6.3 | Zjišťování toxicity nanoželeza měřením životaschopnosti buněk | 45 |
| 4.6.4 | Vizualizace oxidačního stresu fluorochromem | 46 |
| 4.7 | Zjišťování vlivu nanoželeza pomocí optického mikroskopu | 46 |
| 4.8 | Zjišťování vlivu nanoželeza pomocí cytotoxického testu | 47 |
| 4.8.1 | První experiment | 47 |
| 4.8.2 | Vliv pH na velikost nanoželeza a minimalizace kyslíku v kulturách | 48 |
| 4.8.3 | Druhý experiment | 53 |
| 4.8.4 | Třetí experiment | 56 |
| 4.8.5 | Čtvrtý experiment | 58 |
| 4.8.6 | Zhodnocení | 61 |
| 4.9 | Zjišťování vlivu nanoželeza měřením životaschopnosti buněk | 62 |
| 4.9.1 | První experiment | 63 |
| 4.9.2 | Druhý experiment | 65 |
| 4.9.3 | Třetí experiment | 67 |
| 4.9.4 | Zhodnocení | 70 |
| 4.10 | Zjišťování vlivu nanoželeza pomocí fluorochromu | 71 |
| Závěr | | 74 |
| Použitá literatura | | 76 |
| Přílohy | | 80 |
| Příloha A - Návod na přípravu kultivačního média | | 80 |
| Příloha B - Návod pro cytotoxický test CytoTox 96 | | 81 |
| Příloha C - Návod pro kalibraci a měření přístrojem Casy model TT | | 82 |
| Příloha D - Fluorescenční mikroskopie | | 87 |
| Příloha E - Návod pro fluorescenční test Total ROS Detection | | 90 |
| Příloha F - Výsledky cytotoxických testů | | 92 |
| Obrázky v textu | | |
| Obr. 1.1-1: | Anabaena planktonica | 15 |
| Obr. 1.1-2: | Aphanizomenon flos-aquae | 16 |
| Obr. 1.2-1: | Chlamydomonas sp. | 17 |

| | |
|---|----|
| Obr. 1.3-1: Vodní květ na přehradní nádrži Římov | 18 |
| Obr. 2.1-1: Schematický obrázek vzniku železitých nanočástic chemickou metodou | 23 |
| Obr. 2.1-2: Nanočástice nulmocného železa vyrobené redukcí v plynné fázi | 24 |
| Obr. 2.3-1: Nanočástice nulmocného železa Nanofer 25N | 26 |
| Obr. 2.3-2: Nanočástice nulmocného železa Nanofer 25 | 27 |
| Obr. 2.3-3: Nanočástice nulmocného železa Nanofer 25S | 27 |
| Obr. 2.3-4: Částice nulmocného železa μ ZVI | 28 |
| Obr. 3-1: Vliv pH na velikost nanočástic | 32 |
| Obr. 4.3-1: Dispergátor DL 05 | 35 |
| Obr. 4.4-1: Mašínova trubice | 37 |
| Obr. 4.4-2: Přístroj Zetasizer Nano ZS | 39 |
| Obr. 4.5-1: Kultivační box | 41 |
| Obr. 4.5-2: Búrkerova počítačící komůrka | 41 |
| Obr. 4.5-3: Paralelní skupiny sinice <i>Anabaena planktonica</i> | 43 |
| Obr. 4.6-1: Casy model TT | 45 |
| Obr. 4.6-2: Princip měření životaschopnosti buněk | 45 |
| Obr. 4.8-1: Vysrážení nulmocného železa fosfátovým pufrem | 49 |
| Obr. 4.8-2: Buněčný pelet testovaných vzorků | 55 |
| Obr. 4.8-3: Buněčný pelet sinice <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> | 61 |
| Obr. 4.10-1: Buňky kultury <i>Chlamydomonas</i> | 73 |
| Obr. C-1: Kalibrace - výsledky vzorku se živými buňkami | 83 |
| Obr. C-2: Kalibrace - výsledky vzorku s mrtvými buňkami | 84 |
| Obr. C-3: Kalibrace - výsledky vzorku se živými a mrtvými buňkami | 85 |
| Obr. C-4: Optimalizace - zúžení osy x | 85 |
| Obr. C-5: Optimalizace - „zoom“ | 86 |
| Obr. D-1: Příklady některých fluorochromů s příslušnými excitačními a emisními vlnovými délkami | 87 |
| Obr. D-2: Schéma základních součástí fluorescenčního mikroskopu | 88 |

Tabulky v textu

| | |
|---|----|
| Tabulka 4.8-1: Parametry vzorků s přidavkem fosfátového pufru | 49 |
| Tabulka 4.8-2: Koncentrace nanoželeza ve vzorcích | 57 |

| | |
|---|----|
| Tabulka 4.8-3: Koncentrace nanoželeza ve vzorcích | 59 |
| Tabulka 4.9-1: Koncentrace nanoželeza ve vzorcích | 64 |
| Tabulka 4.9-2: Koncentrace nanoželeza ve vzorcích | 68 |
| Tabulka C-1: Vlastnosti kapilár | 82 |
| Tabulka C-2: Maximální limit pozadí | 83 |
| Tabulka F-1: Průměrné hodnoty absorbancí naměřených při prvním testu | 92 |
| Tabulka F-2: Průměrné hodnoty absorbancí naměřených při druhém testu | 93 |
| Tabulka F-3: Průměrné hodnoty absorbancí naměřených při třetím testu | 93 |
| Tabulka F-4: Průměrné hodnoty absorbancí naměřených při čtvrtém testu (první etapa) | 94 |
| Tabulka F-5: Průměrné hodnoty absorbancí naměřených při čtvrtém testu (druhá etapa) | 94 |

Grafy v textu

| | |
|---|----|
| Graf 4.5-1: Počet buněk jednotlivých kultur v 1 ml | 42 |
| Graf 4.8-1: Vliv přídavku pufru na objem vyvinutého vodíku při zjišťování množství nulmocného železa pomocí Mašínovy trubice | 50 |
| Graf 4.8-2: Vliv přídavku kyseliny na objem vyvinutého vodíku při zjišťování množství nulmocného železa pomocí Mašínovy trubice | 51 |
| Graf 4.8-3: Množství rozpuštěného kyslíku v médiu buněčných kultur v závislosti na denním a nočním cyklu | 52 |
| Graf 4.8-4: Vliv nulmocného železa μ ZVI a přídavku kyseliny na cytotoxicitu kultury Chlamydomonas a Anabaena planktonica | 54 |
| Graf 4.8-5: Vliv nulmocného nanoželeza modifikovaného axilátem 32S na cytotoxicitu kultury Chlamydomonas a Anabaena | 57 |
| Graf 4.8-6: Vliv nemodifikovaného nulmocného nanoželeza na cytotoxicitu kultury Chlamydomonas a Anabaena | 59 |
| Graf 4.8-7: Vliv nemodifikovaného nulmocného nanoželeza na cytotoxicitu kultury Aphanizomenon | 60 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Graf 4.9-1: | Kinetika vlivu nulmocného nanoželeza na životaschopnost buněk kultury Chlamydomonas | 64 |
| Graf 4.9-2: | Kinetika vlivu nemodifikovaného nanoželeza a nanoželeza modifikovaného axilátem 32S na životaschopnost buněk kultury Chlamydomonas | 67 |
| Graf 4.9-3: | Vliv nemodifikovaného nulmocného nanoželeza na životaschopnost buněk kultury Chlamydomonas | 69 |
| Graf 4.9-4: | Vliv μ ZVI nulmocného železa na životaschopnost buněk kultury Chlamydomonas | 69 |
| Graf 4.9-5: | Vliv nulmocného nanoželeza modifikovaného pomocí axilátu 32S na životaschopnost buněk kultury Chlamydomonas | 70 |
| Graf F-1: | Vývoj pH ve vzorcích suspenze nanoželeza s přidavkem pufru | 92 |

Seznam použitých zkratek

| | |
|-----------------|--|
| ATP | adenosintrifosfát |
| DMF | dimethylformamid |
| Fe ⁰ | nulmocné železo |
| FITC | fluorochrom |
| GFP | fluorochrom |
| ICP/OES | emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem |
| LDH | laktátdehydrogenáza |
| nZVI | nanočástice nulmocného železa |
| pH | záporný dekadický logaritmus aktivity vodíkových iontů |
| ROS | reaktivní formy kyslíku |
| SOD | superoxid dismutáza |
| TUL | Technická univerzita v Liberci |
| μZVI | mikročástice nulmocného železa |

Úvod

Sinice a zelené řasy tvoří fytoplankton, který je důležitou složkou potravních sítí v rozmanitých vodních ekosystémech. Sinice i řasy plní stejně důležitou úlohu jako rostliny na souši. Zapojují se do fotosyntetického procesu a jsou potravou pro zooplankton a drobné býložravé ryby. Avšak při jejich přemnožení dochází ve stojatých nebo pomalu tekoucích povrchových vodách k tvorbě vodního květu rozpoznatelnému díky charakteristickému sytě zelenému zbarvení vody. Dominantními organismy ve vodním květu jsou většinou sinice, které často obsahují toxické látky cyanotoxiny. Při odumírání vodního květu navíc dochází k výraznému snížení koncentrace kyslíku ve vodě.

Nanoželezo, které se běžně používá jako silné redukční činidlo při sanačních aplikacích, zvyšuje v buňkách mikroorganismů koncentrace reaktivních forem kyslíku (ROS), zejména hydroxylového radikálu $\text{OH}\cdot$. Zvýšená koncentrace ROS způsobuje situaci zvanou oxidační stres. ROS se v organismech běžně vyskytují jako nechtěné vedlejší produkty fotosyntézy a metabolických procesů. Buňky jsou proto do jisté míry schopné se proti těmto volným radikálům bránit pomocí antioxidantů a enzymů, které degradují nebezpečné částice ROS a udržují tak vnitřní homeostázu. Při přílišném zvýšení koncentrace ROS a tedy oxidačního stresu dochází v buňce k peroxidaci lipidů, oxidaci proteinů a nukleových kyselin a následně až k zániku buňky.

Tato diplomová práce se zabývá vývojem metod pro detekci vlivu nulmocného nanoželeza na sladkovodní sinice a řasy. Cílem diplomové práce byla modifikace a optimalizace postupů metod pro určení míry vlivu nanoželeza na růst sinic a řas při různých koncentracích a modifikacích přidávaného železa.

Při experimentech bude použita suspenze nemodifikovaného nulmocného nanoželeza, suspenze nulmocného nanoželeza modifikovaného solí polyakrylové kyseliny a suspenze prototypu nulmocného železa μZVI . Vliv nanoželeza bude zkoumán na dvou běžných zástupcích sinic (oddělení Cyanobacteria) a jedné zelené řase (oddělení Chlorophyta).

1 Mikroskopické sinice a řasy

1.1 Sinice (Cyanobacteria)

Sinice jsou evolučně velice staré mikroorganismy, které se podílely na utvoření kyslíkové atmosféry [1]. Za dobu své existence osídlily různé ekosystémy. Můžeme je nalézt v mořích, ledovcích, horkých vřídlech, jeskyních a dokonce i ve vzduchu. Dokáží žít na nehostinných místech v Antarktidě i na Sahaře.

Jako přirozená součást vodních ekosystémů se vyskytují prakticky se všech typech povrchových vod. Jsou přítomny v silně znečištěných i v čistých vodách, které téměř nejsou ovlivněné lidskou činností. Vyskytují se jako nárosty na kamenech nebo jako součást fytoplanktonu v rybnících a vodních nádržích.

Sinice jsou drobné autotrofní prokaryotické organismy. Jako prokaryota nemají jádro ani mitochondrie. Genetická informace je uložena v jediné kruhové molekule DNA. Jsou buď jednobuněčné, vláknité nebo koloniální.

Jednou z důležitých součástí buňky sinic jsou ploché váčky, thylakoidy, na kterých jsou umístěny fotosyntetické pigmenty. V membráně thylakoidu jsou obsaženy chlorofyl-a, α -karoten, β -karoten a xanthofyly. Na povrchu thylakoidu se nacházejí fykobilizomy, které obsahují specifická barviva zvaná fykobiliny. Dva fykobiliny jsou modré pigmenty (c-fykocyanin, allofykocyanin) a jeden je červený (c-fykoerythrin). Tyto pigmenty umožňují fotosyntézu při nízké hladině světla hluboko pod hladinou.

Kromě vegetativních buněk mívají některé vláknité formy sinic heterocyty. V těchto specializovaných buňkách dochází k fixaci vzdušného dusíku a sinice tak nejsou závislé pouze na dostupných formách dusíku rozpuštěného ve vodě. Dalšími specializovanými buňkami jsou akinety (artrospory), které slouží k přetrvání nepříznivých období.

Další důležitou strukturou jsou aerotopy. Jedná se o válcovité mnohostěnné struktury, kterých je v buňce přítomno velké množství. Jejich stěna je propustná pro všechny plyny rozpuštěné ve vodě. Směs plynů uvnitř aerotopů sinice nadlehčuje a umožňuje jim snadno splývat ve vodním sloupci a měnit svoji polohu. Sinice mohou díky těmto plynovým měchýřkům vystoupat k hladině, kde je dostatek světla

pro fotosyntézu. V okamžiku, kdy je sinic u hladiny velké množství, vyčerpají živiny a dochází k vypuštění plynů z aerotopů nebo k jejich prasknutí vlivem intenzivní fotosyntézy. Sinice klesnou do hlubších vrstev, kde je méně světla. V tomto prostředí, které je bohaté na živiny, sinice spotřebovávají zásoby vytvořené u hladiny. Čerpají živiny do buněk a obnovují aerotopy a jejich funkci. Po čase vystoupají k hladině a celý cyklus se opakuje.

Buněčná stěna sinic je pevná a čtyř-vrstevná. Je tvořena peptidoglykanem a kyselinou diaminopimelovou. Pod povrchem stěny je plazmatická membrána, kde probíhá aktivní transport iontů a dalších látek. Buněčná stěna je často obalena slizem, který u vláknitých sinic vytváří slizovou pochvu. Rozmnožují se výhradně nepohlavně. Dělení buněk probíhá zaškrcováním plazmatické membrány.

Některé druhy sinic vytvářejí cyanotoxiny, což jsou látky sekundárního metabolismu a nejsou organismem využívány pro primární metabolismus [2].

1.1.1 *Anabaena planktonica*

Patří do třídy Cyanophyceae, řádu Nostocales a čeledi Nostocaceae [3]. Buňky sinice jsou zhruba kulovité, přibližně 5–10 μm velké (obr. 1.1-1). Tvoří rovná, několik milimetrů dlouhá a 10 μm široká vlákna, která jsou pokryta slizem. Jedná se o široce rozšířenou sinici na území České republiky. Vyskytuje se zejména ve slabě hnojených rybnících a přehradách.

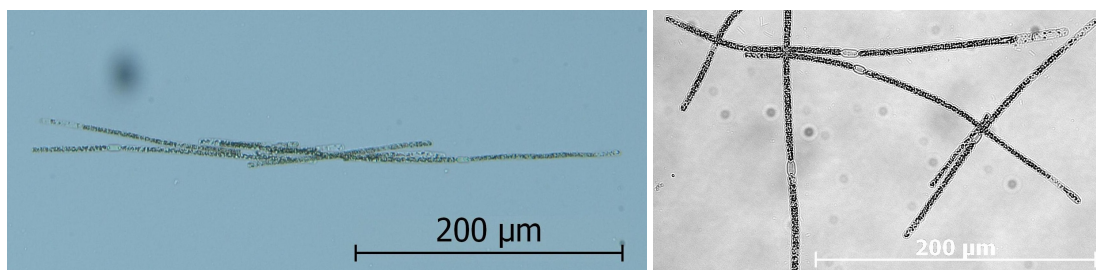


Obr. 1.1-1: *Anabaena planktonica*; [4], [5]

1.1.2 *Aphanizomenon flos-aquae*

Je řazený do třídy Cyanophyceae, řádu Nostocales a čeledi Nostocaceae a je tedy velmi blízce příbuzný sinicím rodu *Anabaena* [3]. Buňky mají cylindrický tvar,

jsou 3–5 μm široké a 7–15 μm dlouhé. Tvoří subsymetrická, rovná vlákna, která často vytváří nepřehledné shluky. Vodní květ tvořený tímto druhem je snadno rozpoznatelný, protože se jeho vlákna sdružují do svazečků, které se podobají drobnému jehličí, jež plave na hladině. Tato sinice se v posledních letech vyskytuje v menší míře, pravděpodobně kvůli příliš vysoké eutrofizaci stojatých vod.



Obr. 1.1-2: *Aphanizomenon flos-aquae*; [4], [5]

1.2 Zelené řasy (Chlorophyta)

Mezi zelené řasy patří velké množství druhů. Toto oddělení obsahuje čtyři hlavní třídy: Prasinophyceae, Charophyceae, Ulvophyceae a Chlorophyceae [1]. Organismy žijí ve sladkých i slaných vodách, v půdě a některé druhy tvoří fotosyntetizující část lišejníků a korálů.

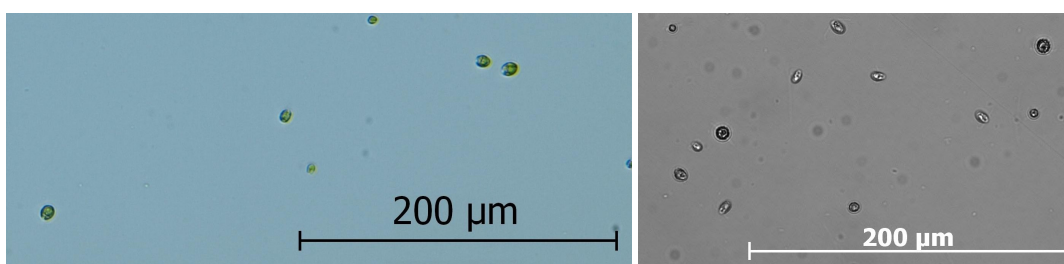
Organismy, patřící do tohoto oddělení, jsou eukaryota, tzn. buňky obsahují pravé buněčné jádro chráněné membránou. Společným znakem celého oddělení je přítomnost chlorofylu-a, chlorofylu-b, α -karotenu a β -karotenu. Chloroplasty mají dvě membrány a obsahují 2–6 thylakoidů v jedné lamele. Hlavní zásobní látkou je škrob či mono- a disacharidy. Buněčná stěna je zpravidla celulózní. Rozmnožují se nepohlavně i pohlavně. Mohou vytvářet kolonie, stélky nebo se vyskytují jednotlivě.

1.2.1 Chlamydomonas sp.

Patří do oddělení Chlorophyta, třídy Chlorophyceae, řádu Volvocales, čeledi Chlamydomonadaceae [1]. V třídě Chlorophyceae se nachází převážně sladkovodní organismy. Jsou však přítomny i organismy mořské a suchozemské. Třída obsahuje jednobuněčné bičíkovce, nevláknité kolonie, nepohyblivé vegetativní buňky, symbiotické řasy v lišejnících, rozvětvené i nerozvětvené vlákna.

Jednou ze dvou čeledí řádu Volvocales je Chlamydomonadaceae. Čeleď obsahuje jednobuněčné jednojaderné organismy. Jejich hlavním znakem je specifická bílkovinná buněčná stěna zvaná chlamys. Neobsahuje polysacharidovou mikrofibrilární složku, ale je celá z glykoproteinu. Organismy mají dva bičíky, které jsou umístěny symetricky na předním konci buňky. Žijí buď samostatně nebo ve specifických typech kolonie, obvykle ve sladkovodních biotopech [2].

Chlamydomonas je samostatně žijící bičíkovec a je oblíbeným organismem pro laboratorní pokusy a modely. Jeho velikost se pohybuje mezi 4 až 11 μm .



Obr. 1.2-1: *Chlamydomonas* sp.; [4], [5]

1.3 Vodní květ

Vodní květ je označení pro stav, kdy dojde ve stojatých nebo pomalu tekoucích povrchových vodách k charakteristickému sytě zelenému až zelenomodrému zbarvení vody (obr. 1.3-1). Toto je způsobeno přemnožením mikroorganismů, zejména sinic. Některé sinice mohou díky aerotopům splývat ve vodním sloupci, vystoupat k hladině a hromadit se zde v podobě zelené kaše nebo drobných, až několik milimetrů velkých částecek, které se podobají drobnému jehličí nebo připomínají zelenou krupici. Koncentrace buněk se ve vodním květu pohybuje od 10^5 buněk/ml [6].

Vodní květ je v českém povodí zaznamenáván minimálně již od 50. let minulého století [7]. Existují však i doklady o masovém rozvoji planktonních sinic, které pochází i z dob starších. Vodní květ je tedy problémem dlouhodobým, který není omezen pouze na posledních několik desetiletí. V 80. a 90. letech však došlo k nárůstu množství eutrofizovaných nádrží a tím i většímu výskytu vodního květu. Dále byly zaznamenány významné změny v druhovém složení a množství biomasy sinicových květů. Na rozdíl od minulosti, kdy převažovaly druhy rodu *Aphanizomenon* a *Anabaena*, začínají dominovat druhy rodu *Microcystis* [7].



Obr. 1.3-1: Vodní květ na přehradní nádrži Římov; Foto: Petr Znachor

Nejčastěji se vodní květ vyskytuje koncem léta, v srpnu a polovině září v eutrofizovaných nádržích. Přemnožení sinic je přirozenou reakcí na zvýšené znečištění povrchové vody minerálními látkami, které jsou pro mikroorganismy důležitými živinami. Patří mezi ně zejména fosforečnany, které z největší části pochází z pracích a mycích prostředků a do povrchových vod se dostávají z kanalizace obcí, kde není zavedeno terciální čištění odpadních vod a ze splachů polí. Další důležitou živinou jsou dusičnany používané v zemědělství při organickém a minerálním hnojení, které se do povrchových vod dostávají smýváním z polí a v nepatrné míře též ze vzduchu a srážek. V posledních desetiletích dochází na některých lokalitách k masivnímu rozvoji již v průběhu června. Intenzivnější rozvoj sinic nastává v úzké závislosti na množství srážek a teplotách vody v nádržích. Pro sinice je optimální suché a teplé počasí, kdy se teplota vody pohybuje mezi 25 až 35 °C. Vodní květ, ve kterém dominují sinice, se vytváří při hodnotách pH 6,5–9 [8].

Sinice vytvářejí toxické látky, cyanotoxiny, které mohou lidem způsobovat střevní a žaludeční potíže. Náhodné požití kontaminované vody zpravidla nevede k akutní otravě, avšak mohou se projevit reakce v podobě průjmu, zvýšené teploty nebo bolesti hlavy. Dále mohou způsobovat alergické a respirační potíže, vyrážky, ekzémy, zarudnutí očí či rýmu a působí toxicky na nervové buňky. Cyanotoxiny se do těla mohou dostat perorálně, nechtěným vypitím vody obsahující sinice nebo také přes rozmočenou pokožku.

Dlouhodobá expozice, zapříčiněná kontaminací pitné vody, může vést k jaterním onemocněním či smrti. V České republice nejsou známy případy otravy cyanotoxiny, které by vedly k úmrtí osob, ale občas dochází k úhynu domácích či divokých zvířat.

Nicméně ve světě jsou známy případy, kdy na následky otravy cyanotoxiny došlo k úmrtí lidí. V roce 1988, při napouštění přehrady Itaparica v Brazílii, bylo zaznamenáno více než 2 000 případů gastroenteritidy (zánětu sliznice žaludku a střev). 88 z nich skončilo úmrtím pacientů. Následně se zjistilo, že viníkem byla vysoká koncentrace sinic rodu *Anabaena* a *Microcystis* v přítocích. Otravy byly zaznamenány pouze v oblastech, kde jako jediný zdroj pitné vody pro tamní obyvatele sloužila voda z přehrady. V australském Palm Island v roce 1979 došlo po zásahu proti vodnímu květu ve vodárenské nádrži k onemocnění 140 osob těžkými poruchami jater. Při odstraňování sinic pomocí modré skalice došlo k vyplavení cyanotoxinů, které se dostaly do pitné vody. Tato otrava nebyla pro žádného z pacientů smrtelná a po vhodné léčbě došlo k zotavení všech osob. V roce 1996 došlo na dialyzační jednotce v brazilském Caruaru k akutní otravě cyanotoxiny. Pacientům byl intravenózně podán dialyzát, který pocházel z nedostatečně upravené vody obsahující sinice. Příznaky poškození jater se projevíly u všech 126 pacientů a došlo k úmrtí 60 osob [9], [10].

Vodní květ způsobuje ztráty provozovatelům koupališť a rekreačních zařízení, která jsou hygienickými stanicemi prohlášena za nevhodná a uzavřena. Toxické a netoxické kmeny téhož druhu od sebe nelze rozpoznat běžnými metodami, a proto jsou preventivně všechny považovány za jedovaté.

Mikroorganismy obsažené ve vodním květu odebírají rybám kyslík, zejména se tak děje při rozkladných procesech odumírání květu a může dojít k masovým úhynům ryb. Ve vodárenských nádržích, ve kterých jsou sinice naprosto nežádoucí, mimo jiné ucpávají filtry a ztěžují úpravu vody.

1.3.1 Způsoby odstraňování vodního květu

Při odstraňování vodního květu je nutné mít na paměti, že ne všechny mikroorganismy jsou nežádoucí, a že plankton, ve kterém dominují řasy, je důležitou součástí potravních sítí. Při neselektivním zásahu může dojít ke změně složení

fytoplanktonu a k posílení dominantního postavení sinic. Metody odstraňování vodního květu by neměly zatěžovat ekosystém a měly by být trvalého charakteru.

Nejúčinnější a nejdůležitější opatření je snížení eutrofizace vodních ploch a tedy i snížení přísunu živin. Tohoto snížení lze dosáhnout především výstavbou moderních čistíren odpadních vod a napojení domácností na kanalizační síť. Fosfor a dusík obsažený v odpadních vodách je nutné odstranit tzv. terciálním stupněm čištění, který však u starších čistíren často chybí [8]. Dalším důležitým omezením přísunu živin do vody je tvorba ochranných nehnojených pásem mezi poli a břehy vodních nádrží.

Bohužel i při okamžitém zastavení přísunu živin vždy trvá několik let, než se dostaví kýžený efekt. Fosfor, akumulovaný v usazeninách na dně vodních ploch během předchozí doby, se může po mnoho let uvolňovat, například za přispění kaprovitých ryb.

Jednou z možností okamžitého snížení fosforu je aplikace látek, na které se fosfor pevně váže a stává se tak pro fytoplankton nedostupný. Takovými látkami jsou například soli železa nebo hliníku. Chemické přípravky na bázi sloučenin hliníku byly aplikovány například na Máchově jezeře, které je často postiženo velmi silným vodním květem [10].

Dalším způsobem boje proti vodnímu květu je podpora rozvoje vodních makrofyt. Je-li pobřežní pásmo vodní plochy zarostlé makrofyty, dochází k odčerpávání živin do rostlinné biomasy, která se může sezónně odklízet [7].

Jiným způsobem je možnost aerace sedimentů nebo promíchávání celého vodního sloupce a odstranění části nebo celého sedimentu, tento způsob je ale značně nákladný.

Nejznámějším přípravkem pro odstraňování vodního květu je modrá skalice (síran měďnatý). Intenzivní aplikace modré skalice se však nedoporučuje kvůli toxicitě mědi. Navíc při masivním odumírání vodního květu dochází k uvolňování toxických látek do vody. Růst sinic je také možné potlačit přidáním slámy z ječmene do vodní nádrže. Účinnou látkou, která se do vody vyluhuje, jsou pravděpodobně fenolické sloučeniny [10].

Další možností zamezení vzniku vodního květu je vysazování dravých ryb ve vodních nádržích, což vede ke snížení počtu ryb živících se planktonem a k podpoření

zooplanktonu. Zooplankton se v malé míře živí právě sinicemi, avšak dává přednost spíše netoxickým a zřejmě i nutričně hodnotnějším řasám. Vysazování býložravých ryb má za následek úbytek vyšší vodní vegetace a následnou podporu fytoplanktonu a tedy i sinic. Herbivorní ryby se také mohou živit přímo vodním květem, avšak stejně jako zooplankton dávají přednost řasám a makrofytům a vodním květem se živí pouze v době, kdy nemají přísun jiné potravy. Kromě toho, některé sinice mohou procházet trávicím traktem bez poškození a navíc mohou načerpat živiny, což je podpoří v jejich dalším rozvoji [10].

Zajímavou možností boje proti sinicím jsou cyanofágy. Cyanofágy jsou viry, které napadají pouze sinice [11]. Infekce se projevuje přítomností modrých skvrn v zeleném vodním květu na hladině. Modré zbarvení je způsobené fykocyaninem, který se uvolňuje z rozpadlých tylakoidů do buňky, kde překryje zelené barvivo [9]. Tyto viry mohou být za určitých okolností klíčovým faktorem ovlivňujícím množství sinic ve vodě. Využití virů zatím brání vysoká specializace virů na určité druhy sinic.

Na sinice má destruktivní účinek také ultrazvuk, který poškozuje heterocyty. Sinice v těchto buňkách fixují vzdušný dusík a slouží jim k regulaci jejich polohy ve vodním sloupci. Ultrazvuková vlna způsobuje, že plyn začne v buňce rezonovat a heterocyty nakonec vyhřejnou. Vlákná sinic poté klesnou na dno, kde je nedostatek slunečního svitu a sinice nemohou fotosyntetizovat, což nakonec vede k jejich zániku. Účinná frekvence je blízká 1 MHz a je závislá na velikosti heterocytů. Tato frekvence by neměla poškozovat ostatní organismy a navíc likviduje právě jenom heterocyty, protože v ostatních buňkách sinic je obsažena cytoplazma a takové buňky ultrazvukovým pulsům odolávají. Tím, že nedochází k destrukci všech buněk, nehrozí uvolňování cyanotoxinů do vody. Ultrazvuková vlna je však ve vodě značně tlumena. Maximální dosah vlny s frekvencí 1 MHz je od zdroje pouhých 20 m [12].

2 Nanoželezo

Železo existuje přirozeně v životním prostředí buď v rozpustné fázi jako železitě nebo železnatě soli, nebo v nerozpustné fázi jako oxidy železa (hematit, magnetit) nebo oxohydroxidy (goethit). Nanoželezo je uměle vytvořený materiál, který svými rozměry získává specifické fyzikální a chemické vlastnosti. Velikost nanočástic železa je menší než 100 nm, a částice mají velký specifický povrch. Jsou tedy velice reaktivní. Díky svým malým rozměrům je nanoželezo mobilní. Zůstává proto po dlouhou dobu ve vznosu a je schopné migrovat v tenkých kapilárách horninového prostředí.

Díky těmto vlastnostem je nanoželezo, jako silné redukční činidlo, používáno při sanačních procesech [17]. Účinně odbourává polychlorované bifenylly, chlorované etheny, orgranochlorové pesticidy a jiné organické halogenované sloučeniny. Dále pak imobilizuje těžké kovy jako je například chrom, arzen či uran. Při sanačních aplikacích in-situ se nanoželezo injektuje do vrtů ve formě vodné suspenze. Poté je unášeno podzemní vodou do jinak nepřístupných míst vzdálených od zasakovacích vrtů. Předpokládá se, že se po určité době nanoželezo a produkty jeho oxidace vysráží na horninovém podkladu.

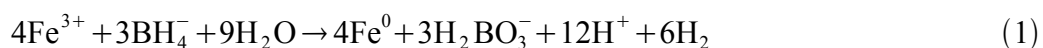
Aplikace nanoželeza na eliminování vodního květu in-situ dosud nebyla vyzkoušena. Existují však studie zabývající se snížením eutrofizace vod pomocí oxidů nanoželeza [18].

2.1 Syntéza nulmocného železa

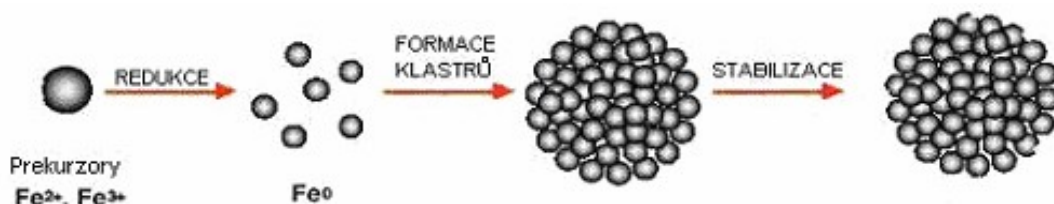
Způsob výroby částic nulmocného nanoželeza má výrazný vliv na jejich velikost, tvar a složení. Výroba je možná dvěma základními metodami, a to fyzikálními nebo chemickými. Mezi fyzikální metody, které jsou založené na mechanickém mletí hrudkovitých materiálů, patří například vysokoenergetické mletí kulovým mlýnem [17]. K vysokoenergetickému frézování se používají konvenční mechanické brusné techniky, které rozbíjejí kovová zrna na mikročástice nebo nanočástice (od 10 nm výše). Fyzikálními metodami není možné vytvářet částice o určité velikosti a proto nejsou tyto metody tolik využívány.

Druhou metodou jsou chemické metody, založené na redukci oxidů železa. Princip těchto metod postupný vznik jednotlivých kovových jader a jejich postupný

růst. Mezi chemické metody patří například redukce v kapalně fázi, při které jsou redukovány hydridy a soli železa. Při této metodě je jako redukční činidlo používán borohydrid (tetrahydroboritan), který je při chemické reakci (1) přidán ve značném stechiometrickém nadbytku a způsobuje rychlý a homogenní růst železných krystalů [19].

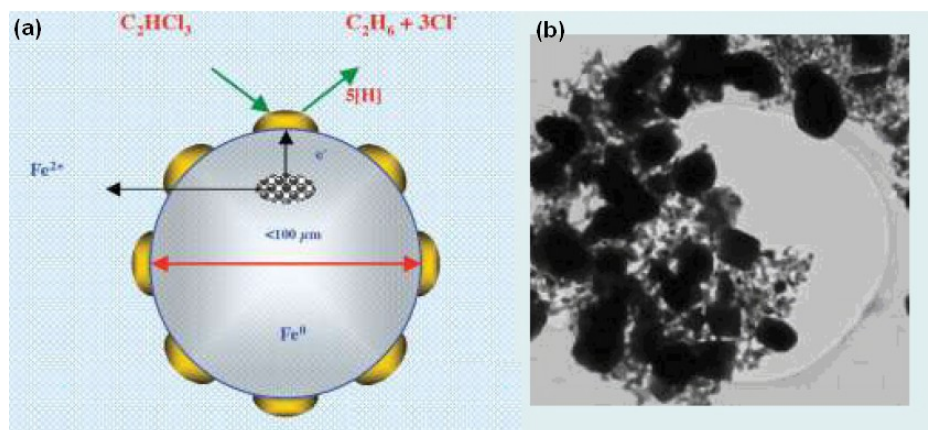


Touto metodou lze vyrobit nanočástice o velikosti 50–100 nm se specifickým povrchem okolo 35 m²/g [19]. Nanočástice připravené touto metodou jsou vysoce reaktivní. Přidáním stabilizačního činidla přímo do redukováného roztoku lze snadno vytvořit disperzi modifikovaných nanočástic [17].



Obr. 2.1-1: Schematický obrázek vzniku železitých nanočástic chemickou metodou; [20]

Další chemickou metodou je redukce v plynné fázi, kdy jsou redukovány částice goethitu či hematitu [17]. Reakce probíhá ve vodíkové nebo inertní atmosféře při teplotách 350–600 °C. Po ochlazení a převedení částic do vodné suspenze je na povrchu částic vytvořena oxidická slupka. Částice vyrobené touto metodou mají průměrnou velikost 50–300 nm a specifický povrch 7–55 m²/g. Jádro tohoto typu nanoželeza je tvořeno nulmocným železem, zatímco obal je tvořený nekompaktní vrstvou složenou z drobných částic magnetitu. Částice nanoželeza tohoto typu jsou poměrně rychle oxidovány, neboť nulmocné jádro není před oxidací chráněno po celé své ploše (viz obr 2.1-2). Částice mohou být dodatečně povrchově modifikovány biodegradabilním surfaktantem.



Obr. 2.1-2: Nanočástice nulmocného železa vyrobené redukcí v plynné fázi;
 (a) schematický obrázek nanočástice železa s nulmocným jádrem obaleným
 nekompaktní vrstvou oxidů, (b) fotografie částice nanoželeza pořízená transmisním
 elektronovým mikroskopem; [21]

Modifikací této metody, kterou využívá firma Nano Iron s.r.o., je redukce oxidu železitého nebo přírodního ferrihydritu ve vodíkové či inertní atmosféře. Po ochlazení jsou částice převedeny do vodné suspenze nebo jsou uchovávány pod dusíkovou atmosférou. Takto jsou chráněny před oxidací a je kdykoli možné vytvoření vodné suspenze pomocí dispergačních jednotek. Změnou reakčních podmínek v redukční peci lze ovlivňovat parametry syntetizovaného nanoželeza jako je například velikost nanočástic, tloušťka oxidické vrstvy nebo její složení. Mezi reakční parametry patří zejména teplota, tlak, doba zdržení a obsah vodíku nebo inertního plynu.

Mobilitu a reaktivitu nulmocného nanoželeza lze ovlivnit pomocí elektrostatické a sférické stabilizace [17]. Při elektrostatické stabilizaci dochází k vytvoření elektrické dvojvrstvy, která zvyšuje povrchový náboj nanočástic. Tuto dvojvrstvu lze vytvořit rozpuštěním iontových sloučenin ve vodné suspenzi, které se adsorbují na povrchu částic a vytvoří okolo nich elektrickou dvojvrstvu. Pokud je elektrický potenciál dostatečně velký, zabraňuje agregaci částic. Při sférické stabilizaci jsou využívány makromolekuly, které kolem nanočástice vytvoří ochrannou vrstvu zabráňující agregaci. Jako stabilizační činidlo je používána kyselina polymaleinová či polyakrylová a jejich soli. Dále pak karboxymethylcelulóza a vyšší karboxylové kyseliny.

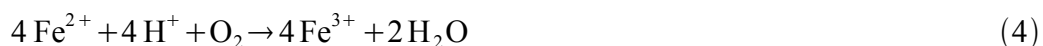
2.2 Reakce nanoželeza

Obecně platí, že nanočástice nulmocného železa jsou velmi reaktivní a vlastnosti jeho povrchu se rychle mění v časovém průběhu a s okolními podmínkami. Nanoželezo koroduje v přítomnosti kyslíku a vody reakce (2) a (3). Při anaerobní korozi je navíc produkován plynný vodík reakce (3) [20].



Následující rovnice popisují vývoj povrchových oxidů a hydroxidů nanočástic železa a jsou biologicky významné [22].

Fe^{2+} mohou být oxidovány na Fe^{3+} :



Fe^{3+} reagují s OH^- nebo s H_2O :



$\text{Fe}(\text{OH})_3$ může také zreagovat na oxohydroxid FeOOH :

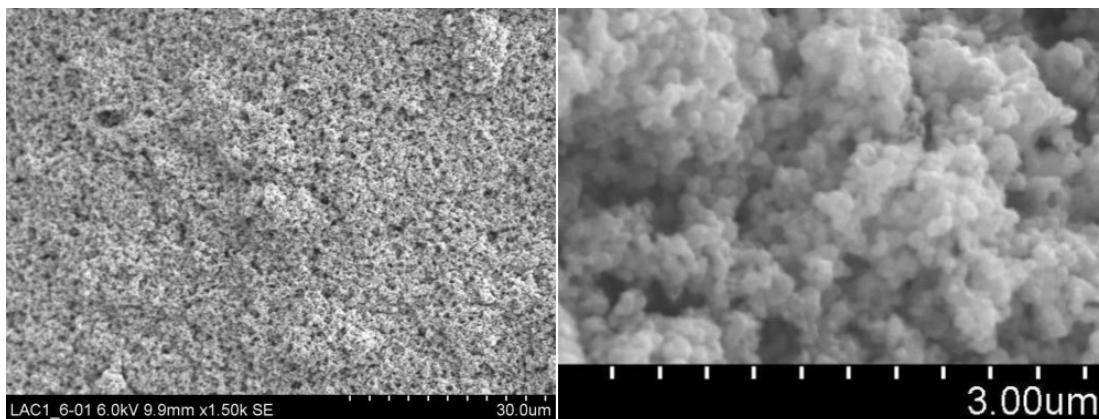


Při nízkých hodnotách pH jsou oxidy železa na povrchu nulmocného železa pozitivně nabitý a přitahují tak aniontové ligandy, obsahující centrální atomy jako sulfát a fosfát. V případě zvýšení pH roztoku nad izoelektrický bod, se povrchové oxidy stávají negativně nabitými a mohou vytvářet povrchové komplexy s kationty reakce (7).

2.3 Technická data nanoželeza Nanofer a prototypu μZVI

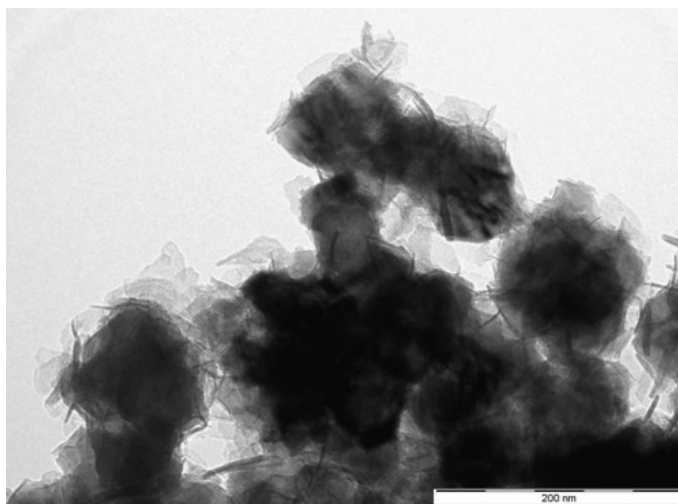
Při experimentech bylo používáno jako výchozí nanoželezo Nanofer 25N, vyráběné firmou Nano Iron, ze kterého byla dispergována suspenze nemodifikovaného nanoželeza identická s komerčně distribuovanou suspenzí Nanofer 25S a suspenze nanoželeza modifikovaného axilátem (solí polyakrylové kyseliny) srovnatelná s komerční suspenzí Nanofer 25S. Nanofer 25N je nanoprášek obsahující nanočástice nulmocného železa bez povrchové modifikace. Produkt se vyznačuje extrémně vysokou reaktivitou, a proto je uchovávaný v inertní dusíkové atmosféře. Je použitelný

pro jakoukoliv sekundární stabilizaci v závislosti na aplikaci nanočástic. Je dodáván v kovových lahvích či sudech obsahujících 1 kg respektive 10 kg produktu. Nanoprášek nulmocného železa uchovávaný pod inertní atmosférou nedegraduje na rozdíl od vodných suspenzí. Proto je možné jej skladovat po neomezeně dlouhou dobu. Příprava suspenze z nanoprášku pomocí dispergačních jednotek a následná aplikace čerstvé suspenze zajišťuje nejnižší možnou míru agregace, sedimentace a degradace nulmocného nanoželeza [23].



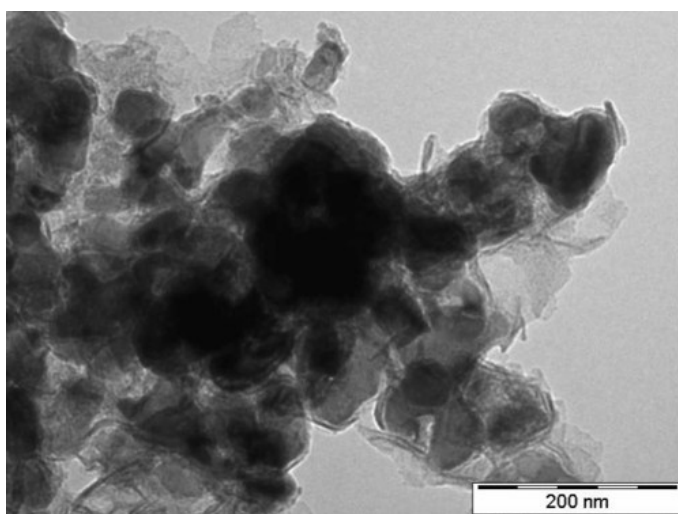
Obr. 2.3-1: Nanočástice nulmocného železa Nanofer 25N; [23]

Jádro nanoželeza Nanofer 25 je tvořeno nulmocným železem, které je stabilizováno výhradně anorganickým modifikátorem chránícím jádro před rychlou oxidací. Hmotnostní obsah pevného podílu je 20 % a hmotnostní obsah nulmocného železa v pevném podílu je přibližně 85 %. Další látky v pevném podílu jsou Fe_3O_4 , FeO a C. Hmotnostní obsah nulmocného nanoželeza v disperzi je 17 %. Nanočástice jsou sférické, jejich velikost je do 50 nm a mají černou barvu. Specifický povrch částic je od $25 \text{ m}^2/\text{g}$. Hustota Fe^0 je $7\,870 \text{ kg/m}^3$, hustota Fe_3O_4 je $5\,700 \text{ kg/m}^3$ a hustota disperze je $1\,210 \text{ kg/m}^3$. Tento produkt se vyznačuje extrémně vysokou reaktivitou, ale vyšší mírou aglomerace a rychlejší sedimentací.



Obr. 2.3-2: Nanočástice nulmocného železa Nanofer 25; [23]

Technická data nanoželeza Nanofer 25S jsou shodná s daty Nanofer 25. Navíc je v kapalně části suspenze přítomný organický stabilizátor, který chrání částice nulmocného nanoželeza před oxidací. Stabilizátor zpomaluje stárnutí nanoželeza, způsobuje menší míru agregace a mírně snižuje reaktivitu částic nanoželeza.



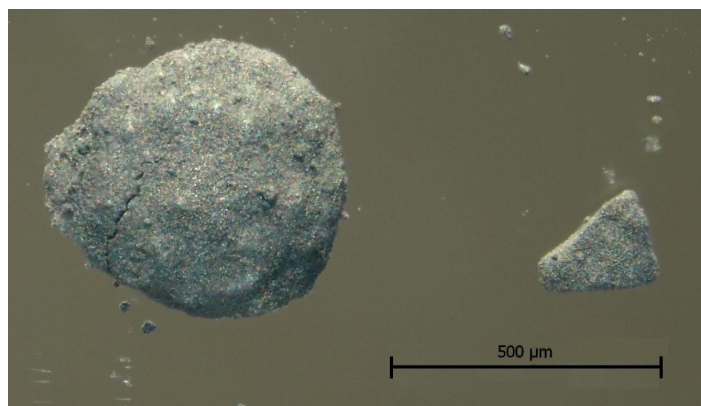
Obr. 2.3-3: Nanočástice nulmocného železa Nanofer 25S; [23]

Oba typy nanoželeza jsou expedovány v ocelových sudech, vyložených polyethylenovým vakem s objemem 25 nebo 50 kg. Malá balení do 1 kg jsou expedována v plastových dózách. Na přepravu nejsou kladeny zvláštní nároky. Nanočástice nulmocného železa jsou velmi reaktivní a postupně se oxidují na Fe_3O_4 , za současného poklesu obsahu nulmocného nanoželeza. Pevný podíl může po delší prodlevě po naplnění do obalů sedimentovat, a proto je nutné před aplikací disperzi v původním obalu homogenizovat. Je třeba omezit styk disperze se vzduchem,

nevystavovat ji zvýšeným teplotám, zpracovat ji v co nejkratším čase a vyvarovat se dlouhodobému skladování [23].

Dalším typem nulmocného železa, které bylo použito při experimentech, je prototyp μ ZVI. Toto železo je vyráběno redukcí v plynné fázi v malé laboratorní redukční peci. Množství vyráběného nulmocného železa se pohybuje v desítkách gramů. Metoda výroby byla vyvinuta Centrem pro výzkum nanomateriálů na Univerzitě Palackého v Olomouci. Toto železo je ve formě malých kuliček, které mají nulmocné jádro obalené velmi tenkou vrstvou železitých a železnatých oxidů. Podíl nulmocného železa je větší než na 90 %. Oproti předchozím typům není nutné jej uchovávat pod inertní ochrannou atmosférou, neboť vrstva oxidů chrání nulmocné jádro před jeho oxidací. Jedná se o prototyp, který zatím není komerčně vyráběn. V současné době se zkoumají jeho vlastnosti a odlišnosti od komerčně vyráběných suspenzí nanoželeza a jeho možné využití.

Před aplikací tohoto typu nulmocného železa je nutné vytvoření vodné suspenze. Tu je možné vytvořit v dispergačních jednotkách nebo pomocí ultrazvukové lázně. Toto železo bylo dodáno ve skleněných zkumavkách, které byly izolovány parafilmem pro eliminování kontaktu se vzdušným kyslíkem.



Obr. 2.3-4: Částice nulmocného železa μ ZVI; [4]

3 Vliv nulmocného nanoželeza na sinice a řasy

Nulmocné nanoželezo výrazně ovlivňuje pH a oxidačně-redukční potenciál prostředí. Oxidačně-redukční potenciál se může snížit o několik desítek až stovek milivoltů, v závislosti na množství přidaného nanoželeza. Snížení oxidačně-redukčního potenciálu ovlivní pH, které je schopné stoupnout až o dvě jednotky. Všechny organismy jsou ovlivňovány prostředím, ve kterém se nacházejí. Jejich vitalita a produktivita je spojena se změnami prostředí a se strategiemi, kterými se se změnami vyrovnávají [17].

Nanočástice železa se mohou za určitých podmínek dostat do vnitrobuněčného prostoru mikroorganismů, nebo mohou ulpívat na povrchu buněk. V případě, kdy je buňka obalena částicemi nanoželeza, může být omezena schopnost jejího pohybu či orientace. Nanoželezo na povrchu buňky může ovlivňovat membránově-iontové a elektrické přechody a může tak narušit základní výměnu živin, plynů či odpadních látek. Částice nanoželeza mohou být absorbovány buňkami mikroorganismů. Proniknutí částic nanoželeza do buňky brání buněčná stěna obsahující póry, které umožňují průchod malých molekul a jednoduchých látek do vnitrobuněčného prostoru. Jejich velikost se pohybuje mezi 5–20 nm. Následuje selektivně permeabilní plazmatická membrána. Průchod většiny částic touto membránou je umožněn pomocí specifických transportních proteinů. Nulmocné nanoželezo s oxidickou vrstvou se může za určitých podmínek dostat do buňky endocytózou. Další možností vstupu nanočástic železa do buňky je prosáknutí přes poškozenou buněčnou membránu.

Pro zkoumání interakce nanočástic železa s buňkou je vhodný například transmisní elektronový mikroskop, kde jsou částice nanoželeza snadno zjištělné pro svou vysokou elektronovou hustotu. Jinou z možností je použití fluorescenčního mikroskopu. Nicméně v případě, kdy jsou částice nanoželeza fluorescenčně značené, nelze jednoznačně určit, zda se částice nacházejí uvnitř buňky nebo zda jsou absorbované na povrchu buňky. Toto nejednoznačné určení do jisté míry odstraňuje konfokální mikroskop, který poskytuje trojrozměrný obraz [17].

Nanoželezo může v buňkách mikroorganismů způsobovat oxidační stres. Oxidační stres je způsobený vysokou intercelulární koncentrací reaktivních forem kyslíku (ROS), kterou je mikrobiální buňka schopna zvládnout. Mezi ROS patří

zejména superoxidové radikály $O_2^{\cdot-}$, hydroxylové radikály OH^{\cdot} a volně rozptýlený, poměrně dlouho přetrvávající, peroxid vodíku. Všechny formy ROS mohou být generovány vně nebo intercelulárně z různých zdrojů. ROS běžně vznikají u prokaryotických i eukaryotických organismů při metabolických procesech v organelách nebo v cytosolu jako vedlejší produkt aerobního dýchání.

Absorbované nanočástice železa mohou iniciovat specifické intercelulární reakce a poškození buněčného metabolismu. Zatímco účinek toxinů na organismus je závislý na množství toxické látky, redoxně aktivní nanočástice železa mohou opakovaně iniciovat buněčné procesy.

Nulmocné nanoželezo reaguje s vodou nebo kyslíkem za vzniku železnatých iontů reakce (2) a (3). Prostřednictvím Haber-Weissových a Fentonových reakcí mohou být ionty železa oxidovány a redukovány za vzniku ROS. Mohou zvyšovat produkci více reaktivních hydroxylových radikálů z méně reaktivního peroxidu vodíku:



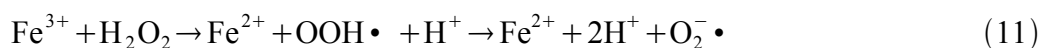
Železnaté ionty mohou být oxidovány na železité,



které pak reagují s radikálním superoxidem a jsou zpětně redukovány:



nebo mohou reagovat s peroxidem za vzniku radikálů superoxidu:



Kromě toho, je-li peroxid vodíku v nadbytku, mohou generované železnaté ionty reakce (11) produkovat více ROS reakce (8). Vzniklé radikály superoxidu mohou uvolňovat Fe^{2+} z ferritinu, intercelulárního proteinu sloužícího jako zásobárna železa, nebo z jiného podobného proteinu obsahujícího uskupení $[4Fe-4S]^{2+}$, čímž dochází k další produkci hydroxylových radikálů.

ROS se v organismech běžně vyskytují jako vedlejší produkty metabolických procesů. Buňky jsou proto schopné se proti těmto volným radikálům bránit pomocí antioxidantů a enzymů, které degradují nebezpečné částice reaktivního kyslíku a udržují

tak vnitřní homeostázu. Pokud se buněčný systém nedokáže se zvýšeným oxidačním stresem vyrovnat, dochází k peroxidaci lipidů a oxidaci proteinů a nukleových kyselin.

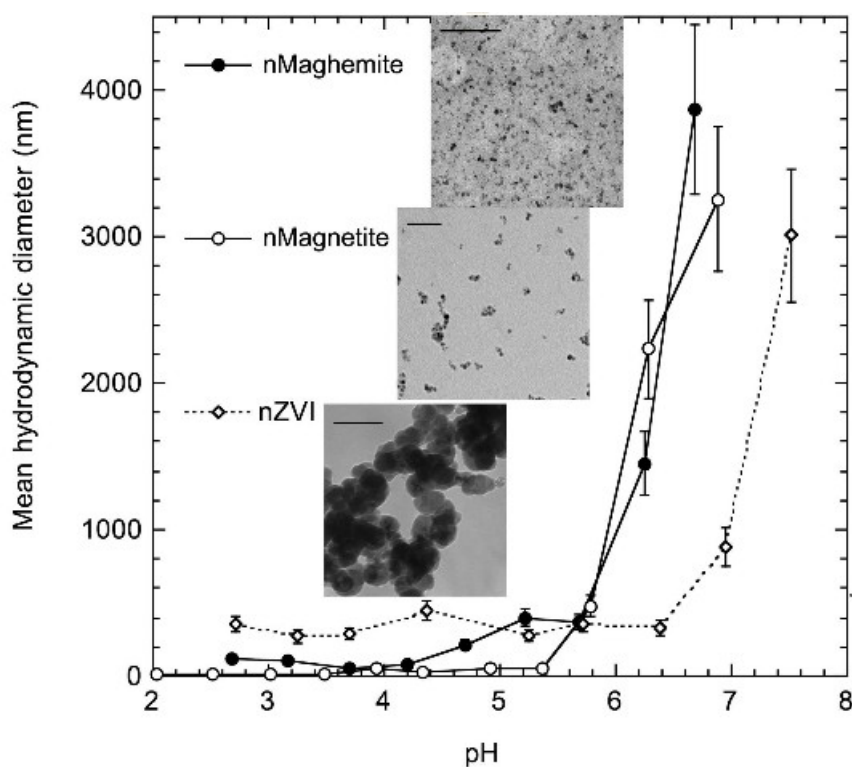
Peroxidace lipidů začíná odtržením vodíku z řetězce nenasycené mastné kyseliny. Výsledný radikál mastné kyseliny může reagovat s kyslíkem a generovat radikál peroxylového lipidu, který dále šíří řetězovou reakci peroxidace lipidů abstrahováním vodíku z dalších nenasycených mastných kyselin [24]. Takže osamocené zahájení může mít za následek převod stovek mastných kyselin na hydroperoxydy lipidů. Peroxidované membránové lipidy ztrácí selektivitu a v extrémních podmínkách může být porušena jejich integrita. Poškozené membrány nemohou správně zajišťovat přenos elektronů a molekul, čímž je následně narušena respirace, fotosyntéza a další metabolické děje. Hydroxylovými radikály nebo přímo Fe^{2+} mohou být poškozeny aminokyseliny, které jsou stavebním prvkem proteinů. Fe^{2+} se může navázat na aktivní místo enzymu a reagovat s peroxidem vodíku za vzniku hydroxylových radikálů. Oxidace nukleových kyselin může vést k mutacím, chybnému čtení či znemožnění replikace DNA.

Pokud by neměla buňka účinné obranné a opravné mechanismy, došlo by při zvýšené koncentraci ROS k apoptóze. Buňky si proto vyvinuly dvě hlavní strategie obrany proti oxidačnímu stresu. První obsahuje antioxidační enzymy, jako superoxid dismutázu (SOD), glutathion-peroxidázu či katalázu. SOD rychle mění superoxid na peroxid vodíku, který je dále glutathion-peroxidázou redukován na vodu. Kataláza přetváří H_2O_2 na H_2O a O_2 ve dvou krocích. Nejprve jednu molekulu H_2O_2 redukuje na vodu a Fe^{3+} z katalázy je převeden na oxid železa (Fe^{5+}). Následně je oxid převeden zpět na Fe^{3+} , zatímco další molekuly H_2O_2 jsou redukovány na H_2O a O_2 . Druhá strategie obrany je založena na opravě enzymů, které odstraní a opraví makromolekuly poškozené oxidací. Oxidované proteiny jsou rozpoznány proteinázou. Poškozená místa jsou buď opravena nebo je protein rozložen na aminokyseliny. Tyto aminokyseliny jsou buď odstraněny nebo dále používány jako zdroje uhlíku pro syntézu ATP. Je pravděpodobné, že většina aminokyselin z oxidovaných a degradovaných proteinů je znovu použita pro syntézu nových proteinů [22].

Železo však patří mezi základní stopové prvky organismů a je důležitou součástí enzymů např. hemoglobinu. Je potřebné při průběhu fotosyntézy, kde se zapojuje do cyklického transportu elektronů ve fotosystému I. Obvykle se vyskytuje v nerozpustné

formě a není tedy pro mikroorganismy dostupné. Proto jej mikroorganismy aktivně přebírají z okolního prostředí do buněk. Jestliže v prostředí s nedostatkem dostupného železa dojde ke zvýšení jeho koncentrace, mohou membránové přenašeče absorbovat železo do buňky, kde ho v krátké době může být přebytek. Aby se zabránilo oxidačnímu poškození, musí být volné železo rychle začleněno do ferritinu, transferrinu, hemu nebo do uskupení $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$.

Vlivem nanočástic železa na bakterii *Escherichia coli* se zabývala i Melánie Auffan a kol. [25]. Ve své studii zkoumali vliv nanočástic nulmocného železa, nanočástic magnetitu a nanočástic maghemitu. Mimo jiné studovali i vliv pH na velikost a stabilitu nanočástic. Experimentálně zjistili, že při nižších hodnotách pH mají částice menší velikost jak je vidět na obrázku 3-1.



Obr. 3-1: Vliv pH na velikost nanočástic; [25]

Nanočástice byly přítomny v 0,01 M roztoku chloridu sodného při teplotě 25 °C a jejich velikost byla určována pomocí metody DLS. Hodnota pH byla upravována pomocí 0,1 M roztoku HCl a 0,1 M roztoku NaOH. Nanočástice byly měřeny po jedné hodině inkubace v roztoku s upraveným pH. Z obrázku 3-1 je patrné, že nanočástice jsou při nižším pH stabilní a mají velikost do 400 nm. V této velikosti se nanočástice vyskytují ve vzorcích, jejichž pH se pohybuje mezi 2–5,5. Při vyšším pH dochází

ve vzorcích k výrazné agregaci a velikost částic roste. Agregace nanočástic nulmocného železa je z použitých vzorků nejmenší. Mikroorganismy jsou obvykle kultivovány v roztocích jejichž pH je podobné fyziologickému roztoku a hodnota pH se pohybuje okolo 7,5. Při tomto pH jsou však nanočástice značně agregované a je snížena jejich mobilita. Při analyzování vlivu nanočástic na *Escherichia coli* a většinu mikroorganismů není možné snížit pH do oblastí, kde jsou nanočástice stabilní ve velmi malých rozměrech. Je však možné snížit pH podle možností a rezistence zkoumané kultury tak, aby byly nanočástice co možná nejmenší a zároveň nebyla poškozena kultura mikroorganismů.

4 Praktická část

4.1 Cíle praktické části

Praktická část byla zaměřena na vytvoření metod pro sledování efektu nanočástic nulmocného železa na růst řas a sinic. Pro kultivační experimenty byly vybrány dva druhy sinic a jeden druh řasy, které se běžně vyskytují v českých vodních nádržích. Cílem práce bylo vytvoření a porovnání několika metod pro určení míry vlivu nanoželeza na růst sinic a řas při různých koncentracích a modifikacích přidávaného železa a jejich optimalizace. Dalším cílem bylo porovnání míry vlivu používaných suspenzí nulmocného nanoželeza na růst sinic a řas.

4.2 Použité materiály

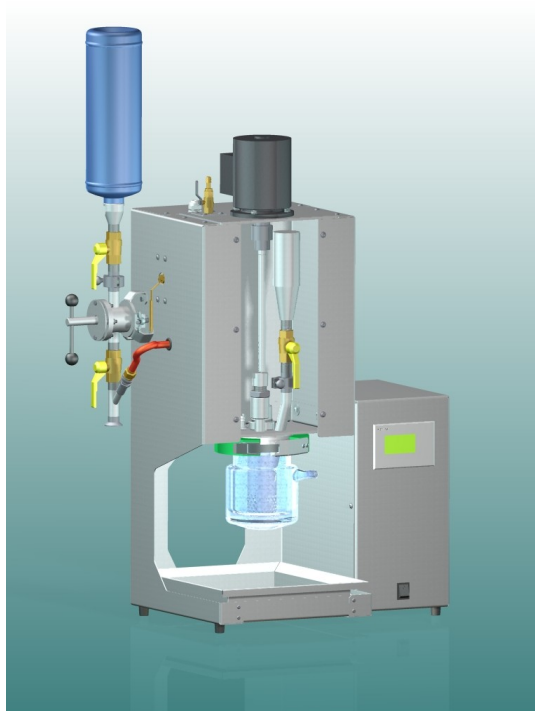
Mikroorganismy použité při experimentech pochází z Hydrobiologického ústavu Biologického centra Akademie věd ČR v Českých Budějovicích. Byly odebrány v červnu a červenci 2009 z Lipenské přehrady. Všechny kmeny ve sbírce jsou klonální. Byly vypěstovány z jednoho vlákna, kolonie či buňky izolované z přírodního planktonu. K izolaci sinic byly použity skleněné kapiláry, kterými byly jednotlivé kolonie či vlákna vybírány a promývány v kapkách čistého kultivačního média. Poté byly přeneseny do jamek mikrotitračních destiček, ve kterých bylo napěstováno větší množství biomasy [26]. Pro experimenty byly vybrány sinice rodu *Anabaena* a *Aphanizomenon* a řasa rodu *Chlamydomonas*.

Výchozím nulmocným železem bylo nanoželezo Nanofer 25N, které je komerčním produktem firmy Nano Iron a je vyráběné suchou cestou v reduktivní peci. Nanoželezo Nanofer 25N je dodáváno ve formě nanoprášku nulmocného železa pod inertní atmosférou. Z tohoto nanoprášku nulmocného železa byla v laboratoři vyrobena vodná suspenze nanoželeza srovnatelná s produktem Nanofer 25 a vodná suspenze nanoželeza modifikovaného axilátem 32S, která je shodná se suspenzí Nanofer 25S. Axilát 32S je vodný roztok sodné soli polyakrylové kyseliny bez přídavku povrchově aktivních látek. Tento roztok je bezbarvý, jeho hustota je $1\,260\text{ kg/m}^3$ a viskozita se pohybuje mezi 200–500 mPa·s při teplotě 23 °C. Dále bylo použito μZVI , které bylo

vyrobeno na Univerzitě Palackého v Olomouci. Jedná se o prototyp, který je vyráběn v laboratorní reduktivní peci v malých množstvích.

4.3 Příprava suspenze nanoželeza

Z nanoželeza ve formě prášku je nutné vytvořit vodnou suspenzi pomocí laboratorního dispergátoru DL 05. Ze zásobní láhve je pomocí kulového čepu nadávkováno požadované množství práškového železa do zásobníku. Zásobník je po té zvážen a je určena přesná hodnota nadávkovaného železa. Z přesné hmotnosti je následně vypočítán objem demineralizované vody a modifikujících látek. Voda je přelita do reakční nádoby z borosilikátového skla a práškové železo je do ní při konstantních otáčkách nasypáno. Tento přístroj pracuje pod ochranou dusíkovou atmosférou, tudíž nedochází k degradaci nulemocného železa vzdušným kyslíkem a je minimalizován objem kyslíku rozpuštěného ve vodě. [23]



Obr. 4.3-1: Dispergátor DL 05; [23]

Připravená suspenze nulemocného nanoželeza je uchovávána ve plastové nádobě. Před každou aplikací suspenze nanoželeza je nutné suspenzi znovu homogenizovat a dispergovat pomocí tyčového mixéru pod dusíkovou atmosférou po dobu minimálně deseti minut. Před aplikací je nutné homogenizovat a znovu dispergovat i komerčně

prodávané suspenze Nanofer 25 a Nanofer 25S, neboť pevný podíl může po delší době sedimentovat.

Nulmocné železo μZVI je používáno také v suspenzi. Ta se připravuje stejným způsobem jako suspenze vyrobená z nanoželeza Nanofer 25N, kdy je nulmocné železo dispergováno do vodné suspenze při vysokých otáčkách. U tohoto typu železa však není nutná dispergace pod inertní atmosférou. V případě výroby suspenze v malém množství, je možné dispergovat nulmocné železo pomocí tyčového mixéru, nebo v ultrazvukové lázni. Při jednotlivých laboratorních experimentech bylo zapotřebí malé množství suspenze tohoto typu železa. Pro vytvoření suspenze bylo nulmocné železo naváženo, poté bylo přilito příslušné množství demineralizované vody a suspenze byla dispergována v ultrazvukové lázni po dobu dvaceti minut.

4.4 Testování nanoželeza

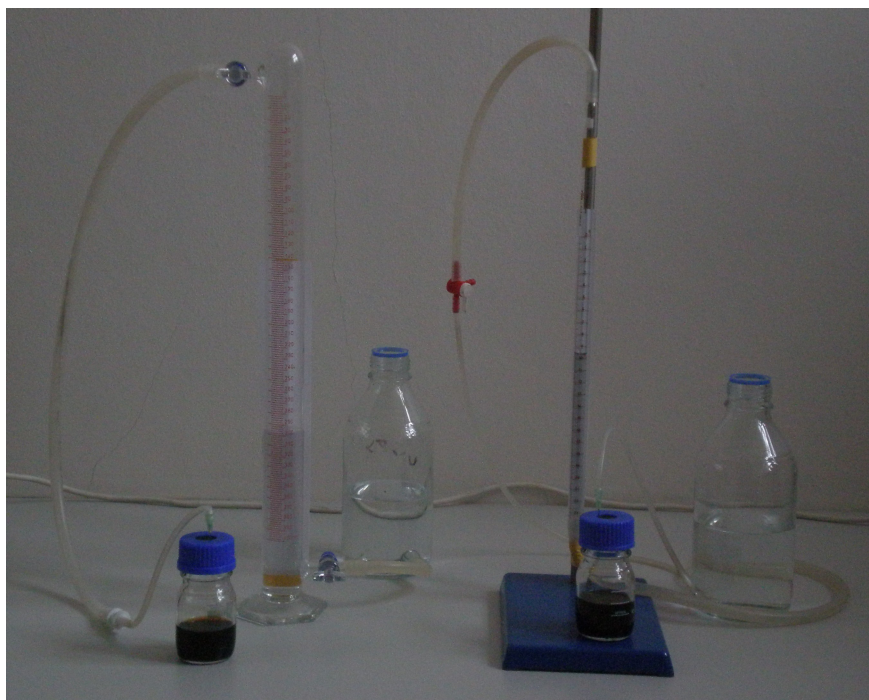
Při laboratorních testech je zapotřebí znalost tří parametrů testovaného nanoželeza. Prvním z nich je podíl nulmocného železa v suspenzi, který udává jeho kondici. Vlivem reakcí (2) a (3) je nulmocné nanoželezo oxidováno a snižuje se jeho podíl v suspenzi ve prospěch vícemocného železa a oxidů. Druhým parametrem je přesné množství celkového železa v suspenzi. Toto se v průběhu času snižuje, neboť suspenze ulpívá na stěnách nádob, ve kterých je uchovávána či znovu dispergována. Třetím parametrem je velikost částic. Ta se s časem zvětšuje v důsledku agregace částic nulmocného železa.

4.4.1 Určení podílu nulmocného a celkového železa v suspenzi

K určení podílu nulmocného železa v suspenzi je používána Mašínova trubice, komerčně dodávaná firmou Nano Iron pod názvem nZVI TESTER [23]. Metoda měření je založena na analyzování objemu vyvíjejícího se vodíku při reakci nulmocného železa s hydrogensíranem draselným nebo kyselinou sírovou podle následujících rovnic:



Do reakční nádoby je naváženo přibližně 5 g hydrogensíranu draselného a 40 ml demineralizované vody. Jednotlivé komponenty jsou sestaveny dle obrázku 4.4-1a. Zásobní láhev je naplněna přibližně 600 ml demineralizované vody a následně je zvednuta nad měřicí válec. Dolní kohoutek musí být otevřený, aby díky výškovému gradientu mohla proudit voda do válce. Horní kohoutek musí být zcela povolený nebo nesmí být připojena hadička u horního kohoutku. Jinak by ve válci vznikl přetlak a demineralizovaná voda by nemohla do odměrného válce proudit.



Obr. 4.4-1: Mašínova trubice; (a) komerčně vyráběná pod názvem nZVI Tester, (b) zmenšená verze aparatury; [27]

Po naplnění měřicího válce a ustálení hladin v zásobní láhvi a válci na úrovni 0 ml, je možno zavřít dolní kohoutek a položit zásobní láhev. Dále je nutné utáhnout horní kohoutek nebo připojit hadičku k reakční nádobě, nechat horní kohoutek otevřený a otevřít dolní kohoutek. Hladina v měřicím válci může klesnout o několik ml, což je způsobeno výškovým gradientem mezi hladinou ve válci a v zásobní láhvi a vytvořením podtlaku v měřicím válci.

Injekční stříkačkou opatřenou jehlou je odebráno cca 5 ml homogenizované suspenze. Tato injekční stříkačka se vzorkem suspenze je zvážena, vzorek je aplikován přes těsnění do reakční nádoby a injekční stříkačka bez vzorku je opět zvážena. Vyvíjející se vodík z rovnice (12) či (13) začne vytlačovat vodu z odměrného válce.

Odečtením hmotnosti injekční stříkačky se vzorkem a bez něj je zjištěna hmotnost aplikované suspenze.

Pro zjištění závislosti hmotnosti suspenze na jejím objemu a pro následné určení množství celkového železa v suspenzi je zapotřebí zvážit 5 ml suspenze. Po ukončení reakce je zásobní láhev zvednuta tak, aby byly vyrovnány hladiny a na měřícím válci je odečten objem vodíku vyvinutého při reakci. K dosažení co nejpřesnějšího výsledku je zapotřebí zohlednit objem aplikovaného vzorku do reakční nádoby odečtením objemu aplikované suspenze od objemu vyvinutého vodíku.

Z rovnice (12) a (13) vyplývá, že za standardních podmínek se při reakci s hydrogensíranem draselným z 55,85 g nulmocného železa uvolní 22,41 dm³ vodíku.

Přesné množství celkového železa v suspenzi je zjištěno následujícím způsobem: 5 ml suspenze je rozpuštěno v 10 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a 5 ml peroxidu vodíku. Dále je doplněno na objem jednoho litru demineralizovanou vodou. Takto připravený roztok je měřen metodou ICP/OES.

Při znalosti hodnot výše popsaných veličin lze vypočíst hmotnostní poměr nulmocného železa ku celkovému železu v suspenzi. Při laboratorních testech i reálných aplikacích je důležité, aby byl poměr nulmocného železa co největší. V případě, že podíl nulmocného železa v suspenzi klesne pod 85 %, je nanoželezo v této suspenzi považováno za příliš zoxidované a pro experimenty nevhodné.

Při vlastních pokusech bylo nutné pracovat s méně koncentrovanou suspenzí nanoželeza, která se, právě díky nízké koncentraci nulmocného železa, nedala analyzovat pomocí komerčně dodávané Mašínovy trubice. Byla proto sestrojena obdobná aparatura (obr. 4.4-1b), ve které bylo tělo měřícího válce nahrazeno 25 ml dělenou pipetou. Díky jejímu menšímu objemu bylo možno odečítat menší množství vyvinutého vodíku a tedy relativně přesně určit podíl nulmocného železa.

4.4.2 Měření velikosti částic nanoželeza

Měření velikosti částic bylo prováděno na přístroji Zetasizer Nano ZS vyráběným společností Malvern Instrument z Velké Británie. Tento přístroj umožňuje kromě měření velikosti částic také měření Zeta-potenciálu a molekulové váhy. Měření je umožněno pomocí kyvet různých typů konstrukcí, které jsou uzpůsobené

požadovanému způsobu měření přístroje. Pro měření velikosti částic je používáno jednorázových polystyrenových kyvet. Tyto kyvety mají o stupeň horší optické vlastnosti než skleněné, avšak nezatížené o možnost chyby měření spojené s jejich špatným vymytím.



Obr 4.4-2: Přístroj Zetasizer Nano ZS; [28]

Velikost měřených částic ve vzorku se musí pohybovat v rozmezí 0,6–6 μm . Systém Zetasizer stanovuje velikost částic nejprve změřením Brownova pohybu částic ve vzorku s použitím dynamického rozptylu světla. Následně pak interpretuje jejich velikost.

Pro měření Brownova pohybu je využíván dynamický rozptyl světla. Měření je prováděno osvětlením částic laserem a analyzováním fluktuace intenzity rozptýleného světla. Měřená částice, osvětlená zdrojem světla, rozptyluje světlo ve všech směrech. Světlo dopadající na detektor vytváří obrazec světlých a tmavých skvrn. Světlé skvrny jsou v místech, kam dopadá světlo odražené od částic se stejnou fází a konstruktivně interferuje za vytvoření jasné skvrny. Tmavé oblasti jsou způsobené destruktivní interferencí a vzájemným vyrušením. Neboť jsou částice v neustálém neuspořádaném pohybu, i interferenční obrazec se v čase mění a intenzita detekovaného světla fluktuuje. Systém Zetasizer měří rychlost fluktuace intenzity a využívá ji pro výpočet velikosti částic pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice, která definuje vztah mezi velikostí částic a jejich rychlostí v důsledku Brownova pohybu [28].

Při samotném měření je do kyvety napipetováno 1–1,5 ml vzorku. Množství vzorku by mělo být při testech zachováno vždy stejné. Kyveta je uzavřena plastovým víčkem a umístěna do přístroje. Následně je vzorek zakryt teplotním víčkem, které

zabraňuje vytvoření teplotního gradientu a ovlivnění Brownova pohybu. V softwaru je vybrána standardní operační procedura, ve které je možno definovat typ používané kyvety, teplotu při které má být vzorek měřen a index lomu analyzovaného vzorku a rozpouštědla. Dále je možno zadat počet cyklů měření, počet běhů v rámci jednoho cyklu, celkovou délku trvání cyklů, prodlevu mezi jednotlivými cykly a poznámky k měření.

4.5 Kultivace mikroorganismů

Pro kultivaci mikroorganismů bylo vybráno WC-médium, které je vhodné pro kultivaci většiny sinic a řas. Připravuje se ze sedmi zásobních roztoků, které musí být přidány ve správném pořadí, aby nedošlo ke vzniku sraženiny. Jejich přesné složení je uvedeno v příloze A. Následně musí být sterilizováno. Sterilizace probíhá ve skleněných lahvích s teflonovým uzávěrem v Papinově hrnci při teplotě nad 100 °C po dobu jedné hodiny. Po zchladnutí média jsou přidány vitamíny, potřebné pro růst mikroorganismů. Tyto jsou přidávány do média až po sterilizaci, neboť by je vysoká teplota degradovala. Aby bylo zachováno médium sterilní, je nutné při přidávání vitamínů pracovat nad kahanem.

Mikroorganismy jsou kultivovány v 250 ml Erlenmeyerových baňkách se zátkou z buničiny, která je prodyšná pro výměnu plynů a pro udržení sterilního prostředí jsou překryty alobalem. Baňky jsou před přeočkováním sterilizovány v sušárně při teplotě 180 °C po dobu jedné a půl hodiny. Po sterilizaci baněk je nutné, aby vychladly. Přeočkování musí probíhat při laboratorní teplotě média i baněk, jinak by mikroorganismy mohly utrpět teplotní šok, což by vedlo ke smrti části mikroorganismů a k pozastavení růstu.

Kultury je nutné přeočkovat jednou za tři až čtyři týdny. Při přeočkování jsou mikroorganismy přeneseny do čerstvého živného média. Při přeočkování je do sterilních baněk nalito 100 ml sterilního média a napipetováno 5 ml kultury. Přeočkování musí probíhat ve sterilním prostředí, a proto je také prováděno pomocí kahanu.

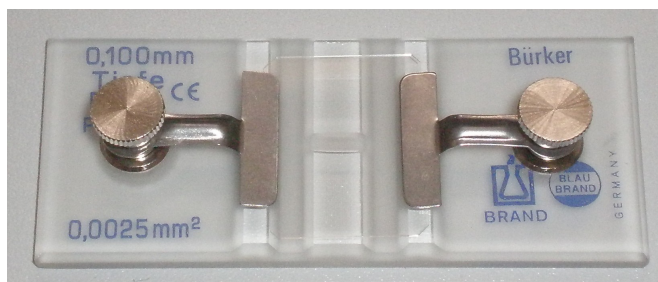
Mikroorganismy jsou umístěny v kultivačním boxu (obr. 4.5-1), který zajišťuje optimální prostředí pro jejich růst. Uvnitř boxu je udržována teplota mezi 19 a 23 °C s čtyřiadvaceti hodinovým cyklem kolísání teploty. Dále je nastaven světelný režim

čtrnáct hodin světlo ($200 \mu\text{mol kvant/m}^2/\text{s}$) a deset hodin tma. Pro rychlejší růst je možno kultury umístit na horizontální třepačku. Při nízkých otáčkách (40–50 otáček za minutu) dochází k rychlejší výměně plynů nad hladinou a přesunu živin.



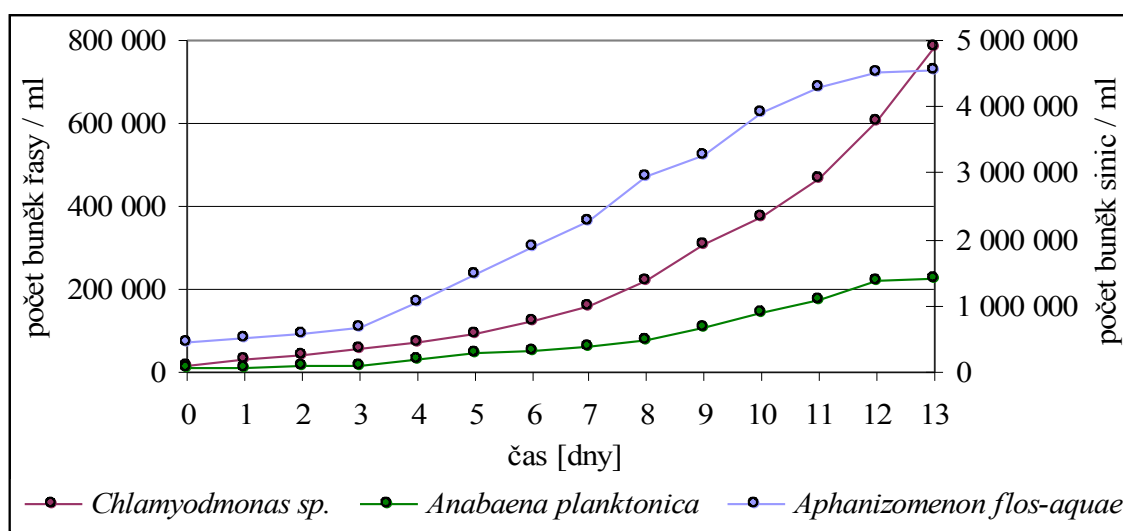
Obr. 4.5-1: Kultivační box; [27]

Při testech jsou používané kultury v době, kdy se nacházejí v exponenciální fázi růstu. V této fázi dochází k intenzivnímu dělení buněk. Počet buněk se během tří dnů zdvojnásobí a populace dosahuje exponenciálního růstu. V této fázi mají buňky v kultuře dostatek živin potřebných ke svému růstu a mohou se bez jakéhokoliv omezení rozmnožovat. Po exponenciální fázi nastává stacionární fáze, ve které se zpomaluje rychlost množení buněk. V této fázi dochází k ustavení rovnováhy a počet nově vzniklých buněk je roven počtu odumřelých buněk. Následuje strmý pokles počtu buněk v kultuře způsobený odumíráním z důvodu nedostatku živin. Pro určení vhodné doby pro nasazování testů od přeočkování byl zjišťován počet buněk v jednotlivých kulturách v závislosti na čase od přeočkování kultury.



Obr. 4.5-2: Bürkerova počítací komůrka; [27]

Počítání bylo prováděno pomocí Bürkerovy počítací komůrky a optického mikroskopu Olympus BX51M při celkovém zvětšení 100×. Po dobu čtrnácti dnů bylo každý den a ve stejnou dobu z kultur odebráno 40 µl média s buňkami. Na Bürkerovu komůrku bylo napipetováno 10 µl a byl spočítán počet buněk v mřížce. Počítání bylo prováděno u každé kultury čtyřikrát. Získané průměrné hodnoty počtu buněk byly přepočítány na objem jednoho mililitru a jsou vyneseny v grafu 4.5-1. Tento graf vystihuje trend růstu jednotlivých kultur, nikoli absolutní množství buněk v paralelních skupinách v závislosti na čase od přeočkování. Při laboratorních testech bylo zapotřebí zjišťovat konkrétní počet buněk v kulturách před počátkem experimentu. Tento parametr je pro většinu testů velice důležitý. Absolutní množství buněk v kultuře závisí zejména na objemu přeočkované kultury a na vitalitě očkováných buněk.

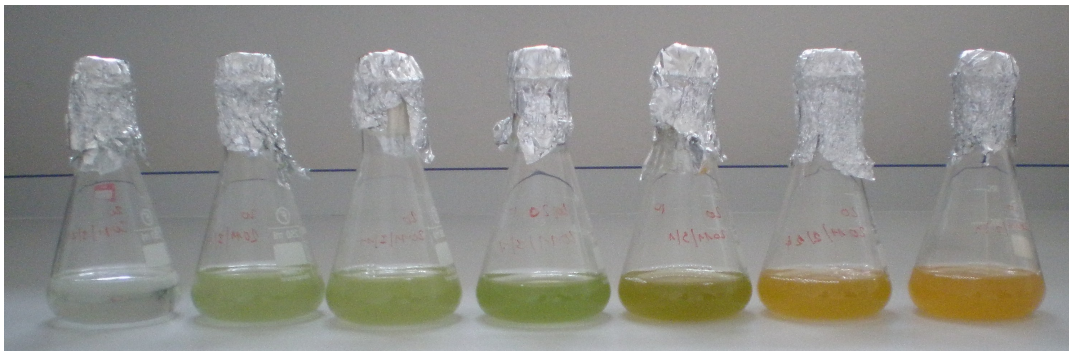


Graf 4.5-1: Počet buněk jednotlivých kultur v 1 ml

Pro experimenty byly používány kultury mezi sedmým až jedenáctým dnem od přeočkování. V této době jsou kultury vitální, v exponenciální fázi růstu a mají dostatečný počet buněk v 1 ml. V případě, že je při testech zapotřebí větší množství buněk v 1 ml jsou kultury zahušťovány pomocí odstředivek. Při centrifugaci byla nastavena rychlost do 1 9000 otáček za minutu, při které nedocházelo k poškození buněk vybraných kultur.

Aby bylo možno průběžné provádění testů, bylo z každé z poskytnutých kultur sinic a řas vytvořeno několik paralelních skupin. Tyto skupiny sloužily také jako záložní zdroj mikroorganismů. V případě, že by nebyly vytvořeny, mohlo by při změně podmínek (teplota, intenzita světla a pod.) dojít k úhynu populace v kultuře a jakékoli

další testy by musely být odloženy do doby, než bychom měli k dispozici nové kultury. Standardně probíhalo přeočkování paralelních skupin s týdenním zpožděním. V období, kdy bylo pro testy zapotřebí více biologického materiálu, probíhalo přeočkování i několikrát týdně.



Obr. 4.5-3: Paralelní skupiny sinice *Anabaena planktonica*; [27]

Z obrázku 4.5-3 je patrný průběh růstu kultury *Anabaena planktonica* v čase. Vlevo je vidět čerstvě přeočkováná kultura. V druhé Erlenmeyerově baňce zleva je vidět kultura po jednom týdnu od přeočkování a je vidět výrazně sytější zelená barva. Směrem doprava následují starší a starší kultury, vždy s jedno-týdenním rozdílem od přeočkování. Na posledních dvou kulturách vpravo je patrná ztráta chlorofylu a odumírání buněk.

4.6 Metody zjišťování vlivu nanoželeza na sinice a řasy

Při laboratorních experimentech bylo testováno několik způsobů detekce vlivu nanoželeza na sinice a řasy. Vliv nulmocného nanoželeza byl nejprve zjišťován pomocí optického mikroskopu Olympus BX51M. Následně byl pro určení míry cytotoxicity použit test CytoTox 96, který kvantitativně měří enzym LDH, jež je uvolňován při lyzi buněk. Další metodou pro zjištění vlivu nanoželeza na sinice a řasy bylo využití přístroje Casy model TT, který analyzuje životaschopnost pomocí měření a vyhodnocování velikosti buněk. Nakonec byl zkoumán oxidační stres v buňkách způsobený nanoželezem pomocí fluorescenční látky pro detekci ROS a fluorescenčního mikroskopu Zeiss Axio Imager A1.

4.6.1 Zjišťování stavu kultury optickým mikroskopem

V první fázi zkoumání vlivu nulmocného nanoželeza byl použit optický metalurgický mikroskop Olympus BX51M. Tento mikroskop pro zvětšení využívá světelných paprsků. Je tvořen soustavou čoček, které mají společnou optickou osu. Zvětšení optických mikroskopů je dáno součinem zvětšení objektivu a okuláru. Zvětšení okuláru bylo 10×, zvětšení objektivů bylo 5× až 100×. Pro pozorování řas a sinic bylo používáno celkové zvětšení v rozsahu 50× až 1 000×, podle zvoleného objektivu.

4.6.2 Zjišťování toxicity nanoželeza cytotoxickým testem

Pro měření toxicity způsobené nulmocným nanoželezem byl využit neradioaktivní cytotoxický test CytoTox 96 vyráběný společností Promega Corporation. V průběhu testu je kvantitativně měřena laktátdehydrogenáza (LDH). Tento stabilní cytosolový enzym je uvolňován při lyzi buněk, kdy dochází k prasknutí plazmatické membrány a k následnému vylití cytosolu a organel ven z buňky a je měřen enzymatickým testem. Sůl tetrazolia je v přítomnosti LDH přeměněna na červený produkt formazan. Množství vytvořené barvy je přímo úměrné počtu lyzovaných buněk a je měřeno pomocí UV-VIS spektrofotometru.

Pro vyhodnocování toxicity látky je zapotřebí vytvoření tří vzorků bez testované, potenciálně toxické látky. Prvním vzorkem je živné médium obsahující buňky, pro které je toxicita testována (vzorek A). Z tohoto vzorku je zjištěna spontánní lyze buněk, ke které dochází za normálních okolností. K druhému vzorku, obsahujícímu také médium s buňkami, je přidán lyzační roztok. Přidání tohoto roztoku způsobí lyzi všech buněk ve vzorku a díky tomuto vzorku je zjištěna maximální koncentrace LDH (vzorek B). Ve třetím vzorku je přítomno pouze živné médium bez buněk, do kterého je přidán lyzační roztok. Tento vzorek slouží k určení pozadí testu (vzorek C). V dalších vzorcích je přítomno kultivační médium s buňkami a testovanými látkami (vzorek D).

Po provedení testu (viz příloha B) jsou vzorky měřeny pomocí UV-VIS spektrofotometru a je odečítána jejich absorbance při 490 nm. Cytotoxicita dané látky je pak vypočítána podle následující rovnice [29]:

$$\text{cytotoxicita} [\%] = \frac{D-A}{B-C} \cdot 100 \quad (14)$$

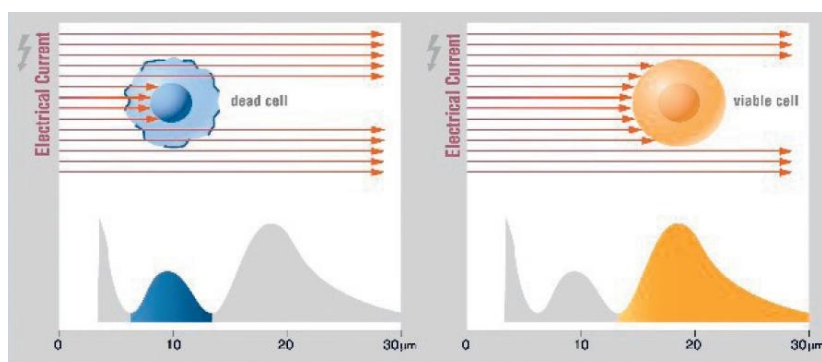
4.6.3 Zjišťování toxicity nanoželeza měřením životaschopnosti buněk

Pro měření životaschopnosti buněčných kultur po aplikaci nulmocného nanoželeza byl využit přístroj Casy model TT vyrobený společností Roche. Při měření je používána neinvazivní metoda, při které nedochází k toxickým účinkům používaných barviv. Měřicí metoda je založena na principu elektrické pulzní prostorové analýzy. Tato metoda maximalizuje získané informace ze signálu vytvořeného při průchodu buněk kapilárou s oblastí nízkého napětí. Při průchodu buněk pórem kapiláry je generován proud, který je usměrněn mezi vnitřní a vnější elektrodou. Každý objekt je snímán s frekvencí měření 10^6 /s. Pulzní prostorová analýza poskytuje s vysokou přesností informaci o velikosti a počtu buněk.



Obr. 4.6-1: Casy model TT; [27]

Stav buněčné membrány výrazně ovlivňuje elektrický signál generovaný při průchodu buňky měřícím pórem (obr.4.6-2). Membrána mrtvé buňky je propustná pro elektrický proud. Změřená velikost potom odpovídá velikosti buněčného jádra, které je pro elektrický proud nepropustné. Přes neporušenou membránu životaschopných buněk nemůže elektrický proud proniknout a změřená velikost je skutečnou velikostí buňky. Tímto jsou od sebe odlišeny poškozené nebo mrtvé buňky od buněk životaschopných.



Obr. 4.6-2: Princip měření životaschopnosti buněk; [30]

Přístroj umožňuje analyzování buněk o velikosti 0,7 až 120 μm pomocí tří kapilár s různou velikostí. Pro analyzování životaschopnosti buněk je zapotřebí kalibrace přístroje na příslušnou kulturu (viz příloha C). Což znamená nastavení velikostních intervalů, ve kterých se nachází buněčné zbytky, mrtvé buňky (neboli velikost jádra) a živé buňky. Měřicí metoda je velice citlivá a je nutné, aby analyzované buňky procházely měřicí oblastí v přiměřené koncentraci. Buněčná kultura je proto izotonicky naředěna prostřednictvím fyziologického elektrolytického roztoku (viz příloha C). Výsledky měření jsou zobrazovány na displeji v podobě grafu nebo jako výčet naměřených hodnot. Na grafickém displeji jsou uváděny hodnoty počtu částic ve vzorku, počtu živých a mrtvých buněk, množství buněčných zbytků, procentuální vyjádření životaschopnosti buněčné kultury a hodnoty dalších veličin [30].

4.6.4 Vizualizace oxidačního stresu fluorochromem

Při experimentech byl použit Total ROS Detection Kit od firmy Enzo Life Science. Sada obsahuje Oxidative Stress Detection Reagent, ROS Inducer, ROS Inhibitor a Wash Buffer Salts. Oxidative Stress Detection Reagent je fluorochrom, který se specificky naváže na reaktivní formy kyslíku a díky jeho fluorescenci je možno identifikovat buňky se zvýšeným oxidačním stresem. ROS Inducer obsahuje pyocyanin, který generuje ROS v buňkách. Vzorek s přidaným roztokem ROS Inducer slouží jako pozitivní kontrola. ROS Inhibitor obsahuje N-acetyl-L-cysteine, který redukuje volné radikály a slouží k negativní kontrole. Sada dále obsahuje Wash Buffer Salts, který slouží k promývání vzorků a k vytvoření ROS Detection Solution.

Po inkubaci a dokončení testu (viz příloha D) je na fluorescenčním mikroskopu Zeiss Axio Imager A1 pozorována fluorescence buněk se zvýšeným množstvím ROS při excitaci 490 nm a emisi 525 nm [31].

4.7 Zjišťování vlivu nanoželeza pomocí optického mikroskopu

Nejprve byl vliv nulmocného nanoželeza zkoumán pomocí optického mikroskopu Olympus BX51M. Koncentrace přidávaného nemodifikovaného nanoželeza se pohybovala mezi 100–2 000 mg/l a vliv nanoželeza byl zkoumán na všech třech kulturách. Inkubace probíhala při laboratorní teplotě po dobu jedné až pěti hodin.

Pro zjišťování vlivu nanoželeza byly zvoleny objektivy se zvětšením 10×, 20×, 50× a 100×. Při zkoumání vlivu nanoželeza pomocí optického mikroskopu nebyly zaznamenány změny ve struktuře testovaných buněk. Výsledky nebyly dostatečně průkazné a dále byl mikroskop používán především pro zjišťování počtu buněk v kultuře před nasazením testů a pro tvorbu fotodokumentace různých jevů při dalších testech.

4.8 Zjišťování vlivu nanoželeza pomocí cytotoxického testu

Při cytotoxickém testu je kvantitativně měřen cytosolový enzym LDH uvolňovaný při lyzi buněk. LDH je v přítomnosti soli tetrazolia přeměněn na červený produkt formazan. Zbarvení vzorku je měřeno pomocí UV-VIS spektrofotometru a intenzita zbarvení je přímo úměrná počtu lyzovaných buněk.

4.8.1 První experiment

Při prvním testu byl zkoumán vliv nemodifikovaného nanoželeza na řasu *Chlamydomonas* sp. a sinici *Anabaena planktonica*. V kultuře *Chlamydomonas* bylo $6 \cdot 10^5$ buněk/ml a v kultuře *Anabaena* bylo $7,5 \cdot 10^4$ buněk/ml. Předpokládaná koncentrace nanoželeza ve vzorcích byla 100 mg/l. Podíl nulumocného železa v suspenzi byl analyzován pomocí komerčně dodávané Mašínovy trubice. V suspenzi bylo obsaženo 87,7 % nulumocného železa. Dále byla měřena velikost částic nanoželeza v suspenzi pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS. Velikost částic se pohybovala od 756,7 nm.

Test byl připravován podle návodu uvedeného v příloze B. Bylo vytvořeno osm duplicitních vzorků. Do šesti zkumavek bylo napipetováno 9,8 ml kultury *Chlamydomonas* a do dvou z těchto zkumavek bylo přidáno 0,2 ml 40× naředěné suspenze nanoželeza (vzorky D). Přesná koncentrace celkového nanoželeza ve vzorcích byla 91 mg/l a vzorky byly inkubovány po dobu tří hodin při laboratorní teplotě. Do zbývajících čtyř zkumavek bylo přidáno 0,2 ml demineralizované vody pro zachování stejného objemu a počtu buněk v jednotlivých vzorcích (vzorky A, B). Do dvou zkumavek bylo napipetováno 9 ml WC-média a 1 ml demineralizované vody (vzorky C). Vzorky s kulturou *Anabaena* byly připraveny stejným postupem.

Do čtyř mikrozkušavek bylo napipetováno 750 μ l média s buňkami (vzorky B) a do dalších čtyř 750 μ l média bez buněk (vzorky C). Ke každému z těchto osmi vzorků bylo přidáno 75 μ l lyzačního roztoku a vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 45 minut. Po skončení inkubace nanoželeza bylo do čtyř mikrozkušavek napipetováno 750 μ l vzorku (vzorky D) a do čtyř mikrozkušavek bylo napipetováno 750 μ l média s buňkami (vzorky A). Všech šestnáct vzorků bylo poté centrifugováno dvacet minut při 1 900 otáčkách za minutu.

Následně byl supernatant přenesen do nových označených mikrozkušavek. Ke všem vzorkům bylo přidáno 750 μ l roztoku SUBSTRATE MIX a následovala 30 minutová inkubace při laboratorní teplotě. Po ukončení inkubace bylo ke všem vzorkům přidáno 750 μ l roztoku STOP SOLUTION a ve vzorcích byla měřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 490 nm. Přístroj byl nulován prostřednictvím čistého média a kyvety byly mezi měřeními vymývány taktéž médiem.

Aritmetické průměry naměřených hodnot absorbancí jednotlivých vzorků jsou uvedeny v příloze F (tabulka F-1). Procentuální vyjádření cytotoxicity bylo vypočítáno pomocí rovnice (14). Suspenze nemodifikovaného nanoželeza v koncentraci 91 mg/l byla pro kulturu *Chlamydomonas* toxická z 19,51 % a pro kulturu sinice *Anabaena* byla suspenze ve stejné koncentraci toxická z –133,33 %. Záporná koncentrace cytotoxicity byla způsobena vyšší hodnotou absorbance pro vzorek lyzovaného média bez buněk, než absorbance vzorku média s buňkami. Tato skutečnost byla připisována příliš malé koncentraci buněk ve vzorku, kdy malé množství uvolněného enzymu LDH vedlo k nízkým hodnotám absorbance.

Nejistota měření spektrofotometru, na kterém byly vzorky měřeny, je pro rozsah 0–0,5 Abs \pm 5 mAbs. Naměřené absorbance jednotlivých vzorků byly nízké, a proto ovlivněné nejistotou měření. Pro dosažení vyšší absorbance bylo zapotřebí v dalších testech pracovat s hustšími kulturami, ve kterých by bylo větší množství LDH enzymu uvolněného při lyzi buněk vlivem nulmocného nanoželeza.

4.8.2 Vliv pH na velikost nanoželeza a minimalizace kyslíku v kulturách

V rešeršní části práce je uvedeno, že při nižším pH mají nanočástice železa menší velikost. Při zjišťování míry toxických účinků nulmocného nanoželeza

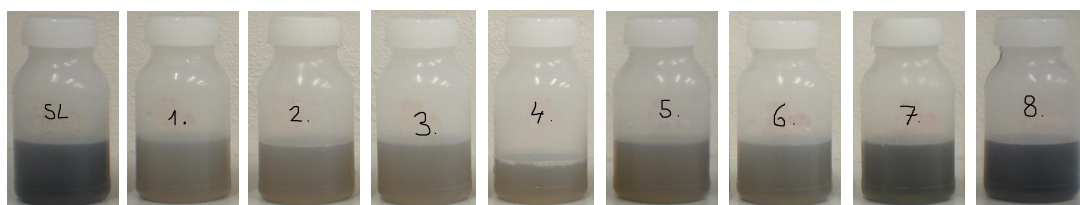
na mikroorganismy je vhodné, aby částice byly co možná nejmenší, a tedy nejreaktivnější. Proto byly hledány vhodné sloučeniny, které by upravily pH vzorků.

Pro zajištění stabilního pH byl nejprve použit fosfátový pufr, který je složen z 0,067 M roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného (K_2HPO_4) a 0,067 M roztoku hydrogenfosforečnanu sodného (Na_2HPO_4). Při pokusu bylo použito kultivační médium bez buněčných kultur. Ke 40 ml média bylo přidáno 10 ml pufru. Bylo vytvořeno osm vzorků s přidavkem pufru a slepý vzorek bez pufru určený k porovnávání. V tabulce 4.8-1 je uvedeno množství jednotlivých složek pufru a velikost částic nejmenších frakcí, měřených po jedné hodině od aplikace pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS.

Tabulka 4.8-1: Parametry vzorků s přidavkem fosfátového pufru

| vzorek | KH_2PO_4 | Na_2HPO_4 | velikost |
|-------------------|--------------------------|---------------------------|----------|
| SL (slepý vzorek) | 0 ml | 0 ml | 1165 nm |
| 1 | 10 ml | 0 ml | 234 nm |
| 2 | 9,5 ml | 0,5 ml | 137 nm |
| 3 | 9 ml | 1 ml | 137 nm |
| 4 | 8 ml | 2 ml | 136 nm |
| 5 | 7 ml | 3 ml | 244 nm |
| 6 | 4 ml | 6 ml | 74 nm |
| 7 | 2 ml | 8 ml | 84 nm |
| 8 | 0 ml | 10 ml | 1846 nm |

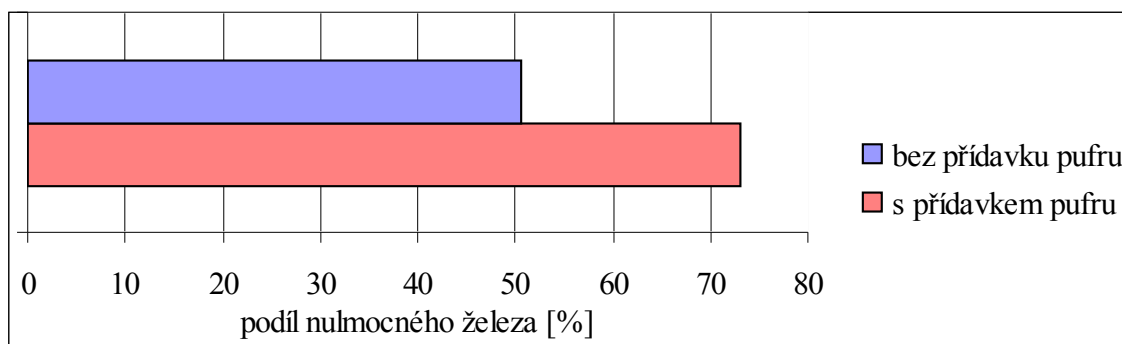
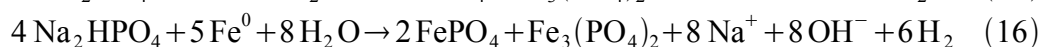
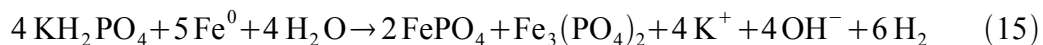
Velikost částic nanoželeza, která byla v některých vzorcích s nastaveným pH změřena, by byla velice příznivá. Avšak změřené částice nebyly nulmocné nanoželezo, ale fosforečnan železitý a železnatý, které vznikly vysrážením nulmocného železa. Toto vysrážení bylo doprovázeno změnou barvy vzorku, jak je patrné z obrázku 4.8-1.



Obr. 4.8-1: Vysrážení nulmocného železa fosfátovým pufrem; [27]

Při chemické reakci fosforečnanů a nanoželeza dochází dále k uvolňování plynného vodíku. Toto bylo zjištěno při analýze množství nulmocného železa

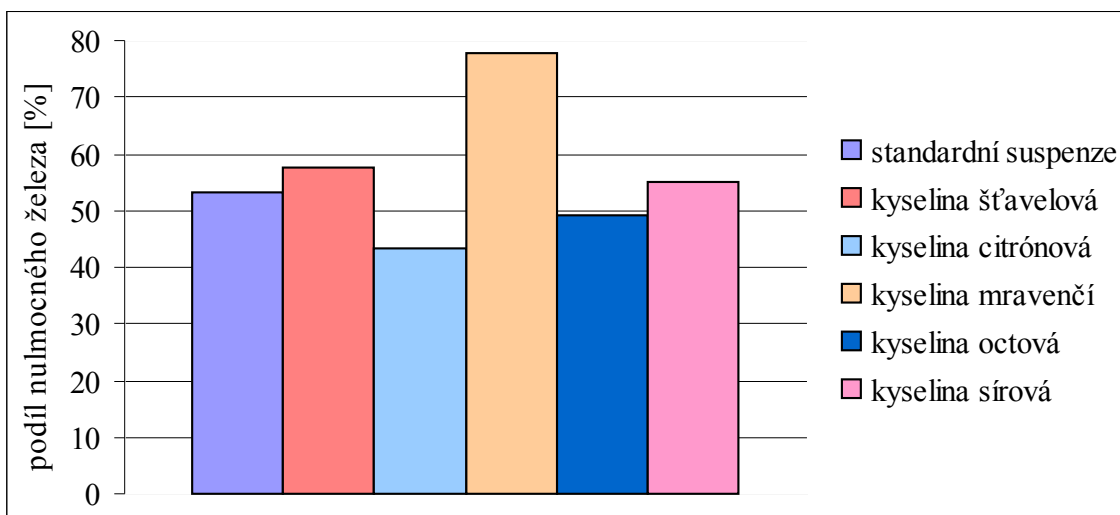
ve vzorcích, kdy se ve vzorku s přidavkem pufru vyvíjelo větší množství vodíku (viz graf 4.8-1), které pocházelo z následujících reakcí s fosforečnany.



Graf 4.8-1: Vliv přidavku pufru na objem vyvinutého vodíku při zjišťování množství nulmocného železa pomocí Mašínovy trubice

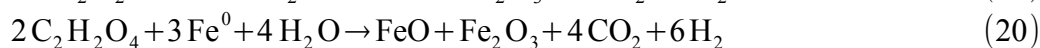
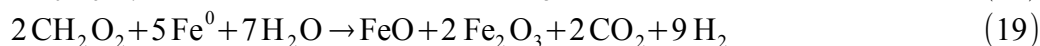
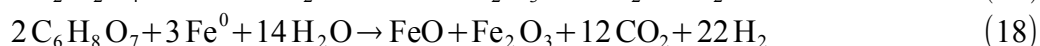
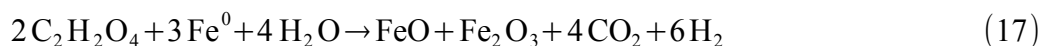
Při vysrážení nanoželeza fosforečnanem dochází kromě vytváření vodíku také ke zvýšení pH vlivem hydroxylových iontů. Graf závislosti pH na přidavku jednotlivých složek pufru je uveden v příloze F (graf F-1).

Po pokusu s fosfátovým pufrem byla hledána vhodnější látka, která by snížením pH udržovala menší velikost nanočástic a zároveň nereagovala s nanoželezem. Byl zkoumán vliv pěti vybraných kyselin: kyseliny šťavelové ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$), citrónové ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), mravenčí (CH_2O_2), octové ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) a sírové (H_2SO_4). První čtyři kyseliny patří mezi slabé kyseliny. Kyselina sírová je silná kyselina, která se používá při úpravě pH pro toxikologické testy. Ke vzorkům byl přidáván takový objem 0,01 M kyseliny, při kterém došlo ke snížení pH vzorku na 6,5. Vliv kyseliny na nulmocné nanoželezo byl zkoumán nejprve pomocí Mašínovy trubice.



Graf 4.8-2: Vliv přidavku kyseliny na objem vyvinutého vodíku při zjišťování množství nulmocného železa pomocí Mašinovy trubice

Z grafu 4.8-2 je patrné, že ve vzorcích s přidavkem kyseliny dochází kromě reakce (12) i k dalším chemickým reakcím (17), (18), (19), (20) respektive (13). Při těchto reakcích dochází k uvolňování jak plynného vodíku tak oxidu uhličitého.

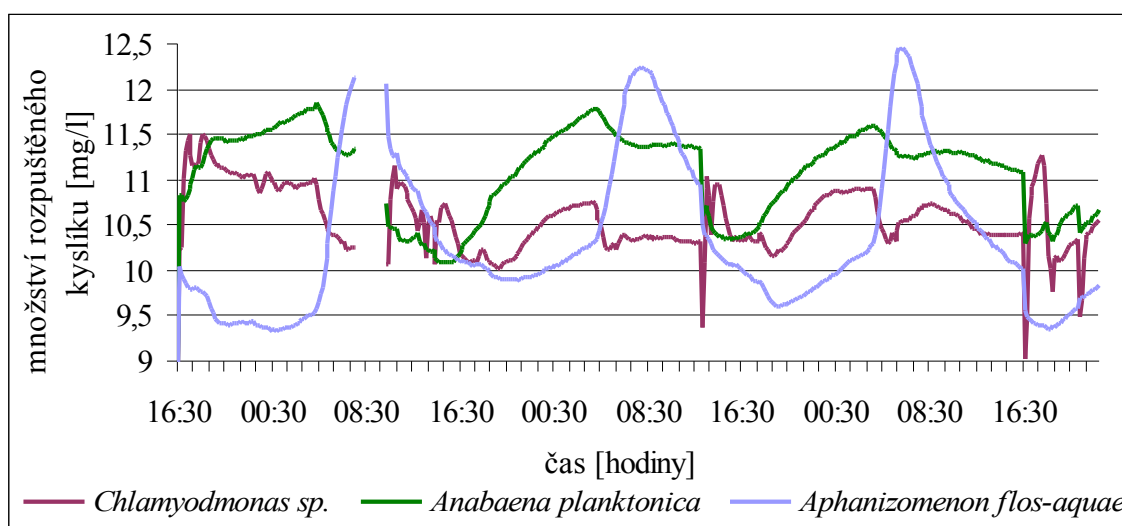


Protože kyselina mravenčí reagovala s nanoželezem v největší míře, byla vyloučena z dalších pokusů. Analýza velikosti částic nulmocného nanoželeza byla prováděna pro kyseliny šťavelovou, citrónovou, octovou a sírovou. Z výsledků této analýzy bylo zřejmé, že největší částice nanoželeza byly ve vzorku s kyselinou šťavelovou. Proto byla tato kyselina také vyloučena. Při dalším cytotoxickém testu (kapitola 4.8.3) byl zjišťován vliv přidavku kyseliny citrónové, octové a sírové na buněčné kultury.

Při analyzování bylo dále zjištěno, že při ředění suspenze dochází ke snížení podílu nulmocného železa. Toto snížení je způsobeno oxidací nulmocného železa rozpuštěným kyslíkem v demineralizované vodě. Suspenze, která při standardní koncentraci (200 g/l) obsahuje 90 % nulmocného železa, po 40násobném naředění obsahuje již pouze 50 až 85 % nulmocného železa. Tento jev nebylo možné eliminovat dispergací méně koncentrované suspenze. V čerstvě dispergované suspenzi s nižší

koncentrací nanoželeza nebylo přítomno podstatně vyšší množství nulmocného nanoželeza. Dále bylo zjištěno, že v méně koncentrované suspenzi dochází k oxidaci nulmocného nanoželeza výrazně rychleji, než u standardní suspenze. Po jednom týdnu od 40násobného naředění či dispergace je v suspenzi obsaženo jen asi 10 % nulmocného nanoželeza, zatímco standardní suspenze po měsíci obsahuje stále přes 85 % nulmocného nanoželeza. Množství nulmocného nanoželeza a jeho oxidace závisí na podmínkách skladování, které byly však pro všechny suspenze stejné. Suspenze byly přechovávány v plastových vzorkovnicích, pro minimalizaci přístupu vzdušného kyslíku byly izolovány parafilmem a uskladněny v chladničce.

Další problém, který bylo nutné eliminovat, je skutečnost, že ve vzorcích se sinicemi a řasou je obsaženo poměrně velké množství rozpuštěného kyslíku. Testované buněčné kultury jsou aerobní, a tudíž potřebují kyslík ke svému růstu, k fungování metabolických procesů a zároveň velké množství kyslíku produkují při fotosyntéze. Kyslík rozpuštěný v živném médiu však oxiduje nulmocné železo a snižuje tak jeho účinnost. Proto byl zjišťován vývoj koncentrace kyslíku v jednotlivých kulturách a možnost jeho minimalizace při pokusech. Do Erlenmeyerových baněk s kulturami byla instalována sonda určená k měření kyslíku. Měření probíhalo po sedmém dni od přeočkování, v době exponenciální fáze růstu buněčných kultur.



Graf 4.8-3: Množství rozpuštěného kyslíku v médiu buněčných kultur v závislosti na denním a nočním cyklu

Z grafu 4.8-3 je patrné, že obsah rozpuštěného kyslíku v kulturách kolísá v čtyřiaadvaceti hodinovém cyklu. Výpadek signálu mezi sedmou a desátou hodinou

druhého dne byl způsobený vybitím akumulátoru multimetru Multi 3430. Původní nastavení boxu bylo 14 hodin světlo, 10 hodin tma. Cyklus začínal temnostní fází v 16:00. Nejmenší množství kyslíku je v kulturách obsaženo v temnostní fázi, kdy nedochází k uvolňování kyslíku při fotosyntéze [13]. Proto byl kultivační box resetován v 8:00. Denní fáze potom pro sinice a řasy začínala v 18:00 a noční v 8:00. Nasazování testů probíhalo okolo 10:00, kdy bylo přítomno nejméně rozpuštěného kyslíku a tím byla dosažena menší míra oxidace nulmocného nanoželeza a jeho větší účinnost.

4.8.3 Druhý experiment

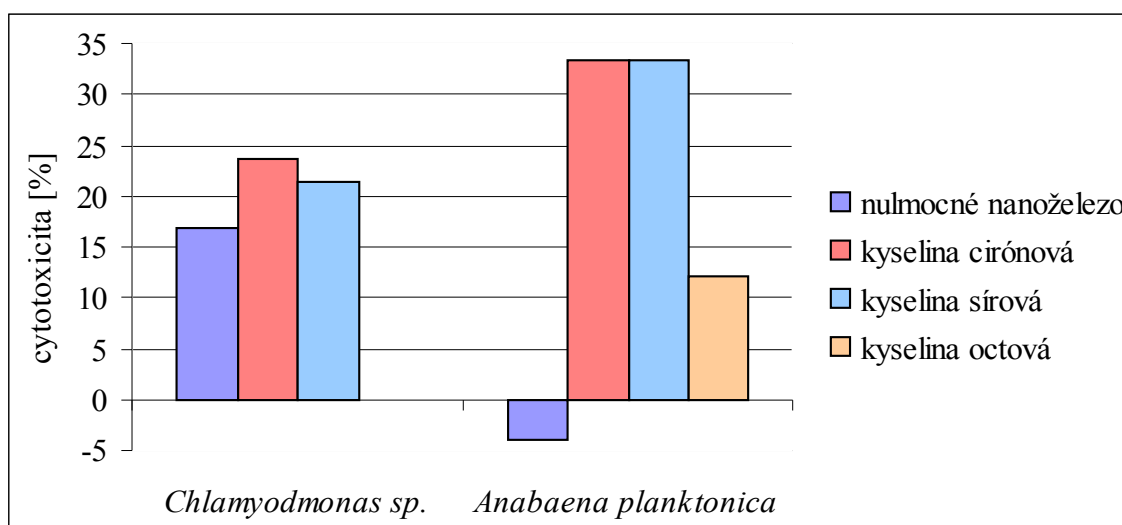
Při druhém cytotoxickém testu byl zkoumán vliv prototypu nulmocného železa μ ZVI na řasu *Chlamydomonas* sp. a sinici *Anabaena planktonica*. Kultury byly před začátkem testu zahuštěné centrifugací po dobu čtyř minut při 1 900 otáčkách za minutu. V kultuře *Chlamydomonas* bylo po centrifugaci $5,1 \cdot 10^6$ buněk/ml a v kultuře *Anabaena* bylo $1,2 \cdot 10^6$ buněk/ml. Koncentrace nanoželeza ve vzorcích byla 200 mg/l. Podíl nulmocného železa v suspenzi analyzovaný pomocí zmenšené aparatury Mašinovy trubice byl 93,6 %.

Bylo vytvořeno dvanáct duplicitních vzorků. Do čtyř zkumavek byly naváženy 2 mg nulmocného železa a poté bylo do dvou z nich napipetováno 10 ml kultury *Chlamydomonas* a do zbývajících dvou zkumavek 10 ml kultury *Anabaena* (vzorky D). Do čtyř zkumavek bylo napipetováno po 1 ml kultury *Chlamydomonas* a do dalších čtyř po 1 ml kultury *Anabaena* (vzorky A, B). Do dvou zkumavek bylo napipetováno 10 ml WC-média (vzorky C). Dále bylo do šesti zkumavek napipetováno 1,5 ml kultury *Anabaena*, do dvou z nich bylo přidáno 14 μ l 0,01 M kyseliny citrónové, do dalších dvou bylo přidáno 17 μ l 0,01 M kyseliny sírové a do posledních dvou zkumavek bylo přidáno 30 μ l 0,01 M kyseliny octové. Do čtyř zkumavek bylo napipetováno 1,5 ml kultury *Chlamydomonas*, do dvou z nich bylo přidáno 14 μ l 0,01 M kyseliny citrónové a do dalších dvou bylo přidáno 17 μ l 0,01 M kyseliny sírové (vzorky D). Pomocí těchto vzorků byl zjišťován vliv přídavku kyseliny na mikroorganismy při snížení pH na 6,5. Množství kyseliny přidané do vzorku bylo voleno tak, aby snížení pH minimálně ovlivnilo růst kultur a přitom mělo vliv na velikost částic nulmocného nanoželeza. Vzorky s přidaným železem a kyselinou byly inkubovány po dobu tří hodin při laboratorní teplotě.

Do čtyř mikrozkušavek bylo napipetováno 500 μ l média s buňkami (vzorky B) a do dvou 500 μ l média bez buněk (vzorky C). Ke každému z těchto šesti vzorků bylo přidáno 50 μ l lyzačního roztoku a vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 45 minut. Po skončení inkubace nanoželeza a kyselin bylo do mikrozkušavek napipetováno 500 μ l vzorku (vzorky D). Dále bylo do čtyř mikrozkušavek napipetováno 500 μ l média s buňkami. Všechny čtyřicet vzorků bylo centrifugováno dvacet minut při 1 900 otáčkách za minutu.

Následně byl supernatant přenesen do nových označených mikrozkušavek. Ke všem vzorkům bylo přidáno 500 μ l roztoku SUBSTRATE MIX a následovala 30 minutová inkubace při laboratorní teplotě. Po ukončení inkubace bylo ke všem vzorkům přidáno 500 μ l roztoku STOP SOLUTION a ve vzorcích byla měřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 490 nm. Přístroj byl nulován prostřednictvím čistého média a kyvety byly mezi měřeními vymývány taktéž médiem.

Procentuální vyjádření cytotoxicity jednotlivých vzorků bylo vypočítáno z aritmetických průměrů naměřených hodnot pomocí rovnice (14) a je vyneseno v grafu 4.8-4, aritmetické průměry hodnot absorbancí jsou uvedeny v příloze F (tabulka F-2).



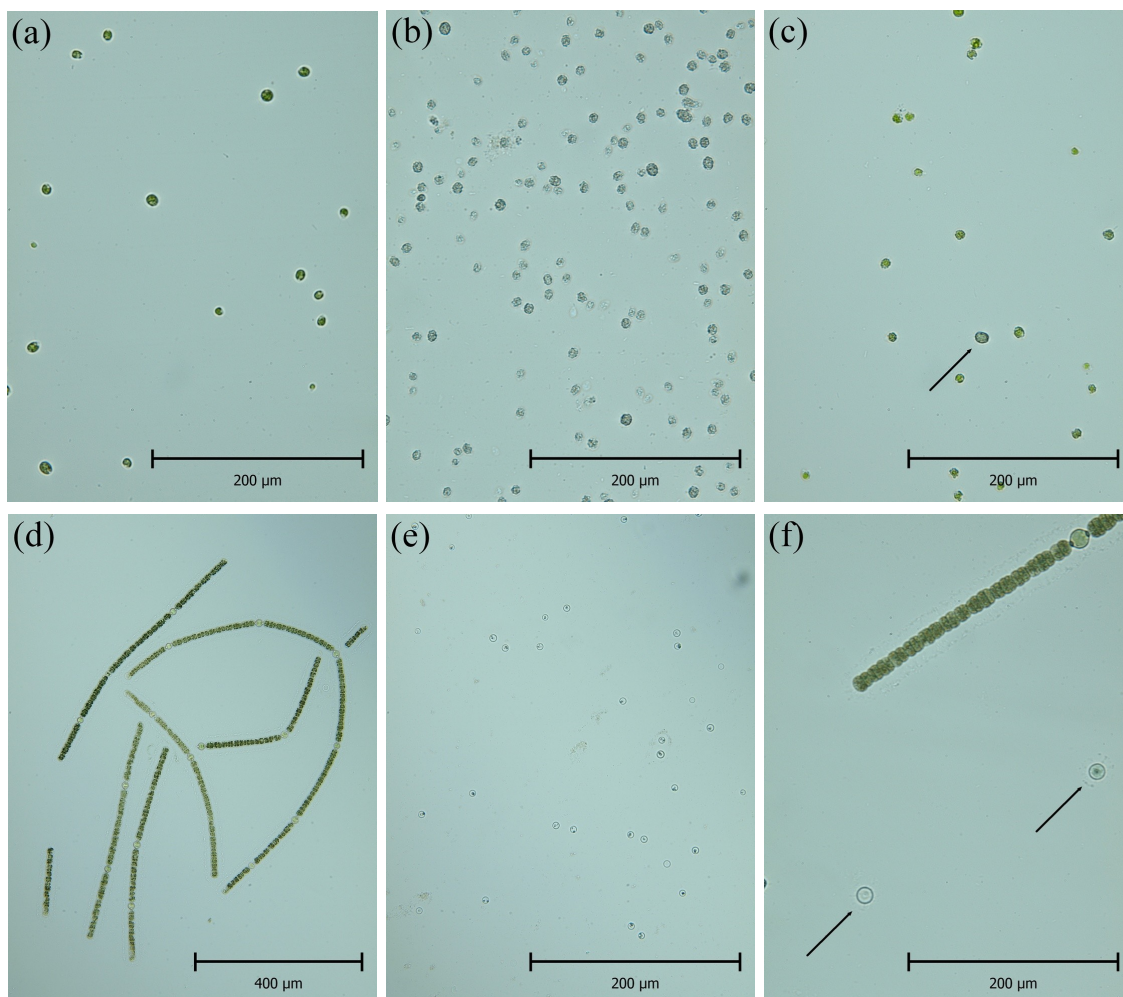
Graf 4.8-4: Vliv nulmocného železa μ ZVI a přidavku kyseliny na cytotoxicitu kultury *Chlamydomonas* a *Anabaena planktonica*

Z grafu 4.8-4 je patrné, že přidavek kyseliny octové způsobuje nejmenší cytotoxicitu, a proto byla při dalších experimentech pro snížení pH používána právě tato kyselina. Dále je patrné, že nulmocné železo μ ZVI mělo na kultury minimální vliv. Prototyp nulmocného železa nebyl před testem nijak upravován. Nulmocné železo bylo

naváženo do zkumavek a následně k němu byla napipetována kultura *Chlamydomonas*. Předpokládali jsme, že se kuličky nulmocného železa samovolně zcela rozptýlí. Vzhledem k tomu, že nulmocné železo zůstalo v kuličkách a rozpustilo se jen minimálně, byla jeho interakce s organismy mizivá a tomu odpovídal i jeho malý vliv na mikroorganismy. Navíc vlákna sinice *Anabaena* obsahují aerotopy a jsou schopná vznášet se ve vodním sloupci, zatímco kuličky nulmocného železa klesaly ke dnu. Proto byly vzorky při dalších testech umisťovány na vertikální rotační třepačku pro zvýšení kontaktu mezi nanoželezem a mikroorganismy.

Velikost nulmocného železa nemohla být při experimentu analyzována, protože se prakticky nerozpustilo a zůstalo v kompaktních kuličkách o velikosti 100–800 μm .

Po provedení experimentu byl buněčný pelet zkoumán pomocí optického mikroskopu Olympus BX51M. Na obr. 4.8-2 jsou zobrazeny jednotlivé vzorky.



Obr. 4.8-2: Buněčný pelet testovaných vzorků; [4]

Na obr. 4.8-2 (a) až (c) je vidět kultura řasy *Chlamydomonas*, na obr. (d) až (f) je kultura sinice *Anabaena*. Na obr. (a) a (d) jsou vzorky kultur bez přidaného lyzačního roztoku, které sloužily pro zjištění spontánní lyze buněk. Jak je vidět, buňky kultur jsou bez jakýchkoliv poškození. Na obr. (b) a (e) jsou vzorky po přidání lyzačního roztoku. Tyto vzorky sloužily ke zjištění maximální lyze buněčné kultury. Z obrázků je patrné, že došlo k prasknutí plazmatické membrány a k vylití obsahu buněk ven. Pomocí mikroskopu nebyly pozorovány žádné živé buňky v těchto vzorcích. Na obr. (c) a (f) jsou vidět vzorky, ke kterým bylo přidáno nulmocné železo. U obou kultur byly pozorovány lyzované buňky i přesto, že vlákna sinice byly v minimálním styku s částicemi nulmocného železa a vypočítaná cytotoxicita je záporná.

4.8.4 Třetí experiment

Při třetím cytotoxickém testu byl zkoumán vliv nanoželeza modifikovaného axilátem 32S na řasu *Chlamydomonas* sp. a sinici *Anabaena planktonica*. Kultury byly před začátkem testu zahuštěny centrifugací po dobu pěti minut při 1 500 otáčkách za minutu. V kultuře *Chlamydomonas* bylo po centrifugaci $4,7 \cdot 10^6$ buněk/ml a v kultuře *Anabaena* bylo $1,3 \cdot 10^6$ buněk/ml. Předpokládaná koncentrace nanoželeza ve vzorcích s řasou *Chlamydomonas* byla 50, 100, 500 a 1 000 mg/l. Vliv modifikovaného nanoželeza na sinici *Anabaena* byl zjišťován při koncentraci 500 mg/l. Množství nulmocného železa v suspenzi bylo analyzováno pomocí zmenšené aparatury Mašinovy trubice. Ve 40× ředěné suspenzi bylo obsaženo 70,8 % nulmocného modifikovaného železa. Dále byla měřena velikost částic nanoželeza v suspenzi pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS. Velikost modifikovaných částic byla 96,0 nm.

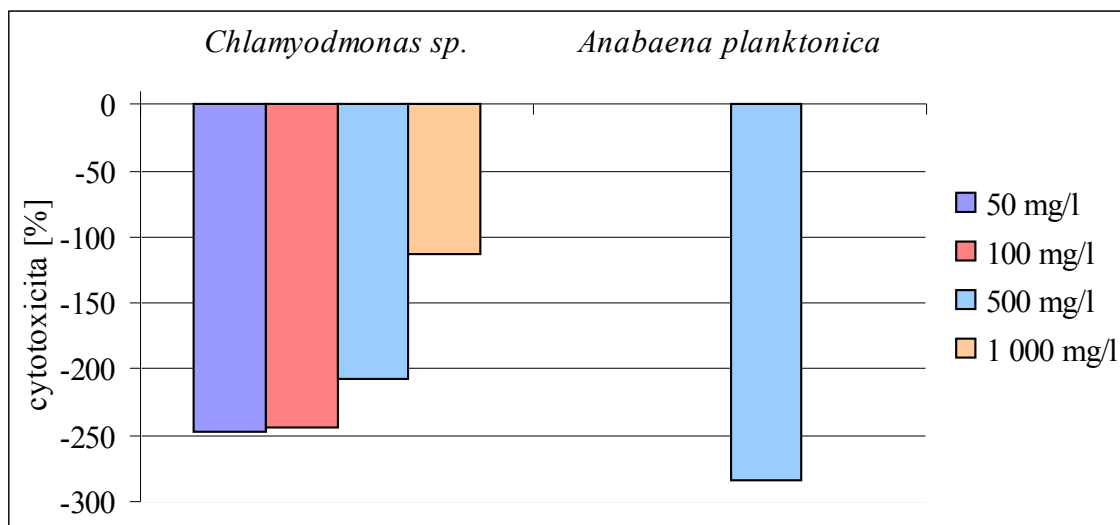
Bylo vytvořeno deset duplicitních vzorků. Do dvanácti zkumavek byly napipetovány 4 ml kultury *Chlamydomonas*. Vždy do dvou z těchto zkumavek bylo přidáno 50 µl, 100 µl, 500 µl a 1 ml suspenze modifikovaného nanoželeza. Těchto osm vzorků bylo doplněno demineralizovanou vodou na objem 5 ml (vzorky D). Do zbývajících čtyř zkumavek byl přidán 1 ml suspenze axilátu 32S bez nanoželeza (vzorky A, B). Stejným postupem byly připraveny vzorky A, B a vzorek D 500 s kulturou *Anabaena*. Dále byly do dvou zkumavek napipetovány 4 ml kultivačního média a 1 ml suspenze axilátu 32S bez nanoželeza (vzorky C). Vzorky byly inkubovány po dobu tří hodin při laboratorní teplotě. Všechny vzorky byly umístěny na vertikální

rotační třepačku Plunotech s nulovou dobou zdržení v krajních pozicích a s rychlostí otáčení pět otáček za minutu. Vzorky byly míchány po celou dobu testu. Přesné koncentrace nanoželeza ve vzorcích jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 4.8-2: Koncentrace nanoželeza ve vzorcích

| Označení vzorku | Objem suspenze [μ l/5 ml] | Obsah celkového železa [mg/l] |
|-----------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 50 mg/l | 50 | 50,38 |
| 100 mg/l | 100 | 100,77 |
| 500 mg/l | 500 | 503,84 |
| 1 000 mg/l | 1 000 | 1007,67 |

Testované vzorky byly připravovány a měřeny stejným postupem jako při druhém experimentu. Naměřené hodnoty absorbancí se pohybovaly v rozmezí 0,077 až 0,734 Abs a jejich aritmetické průměry jsou uvedeny v příloze F (tabulka F-3). Z těchto hodnot byla pomocí rovnice (14) vypočítána procentuální cytotoxicita pro jednotlivé vzorky D a je vynesena v grafu 4.8-5.



Graf 4.8-5: Vliv nulmocného nanoželeza modifikovaného axilátem 32S na cytotoxicitu kultury Chlamydomonas a Anabaena

Vysoké hodnoty naměřených absorbancí nebyly způsobeny vyplavením většího množství LDH enzymu z hustší kultury, nýbrž změnou barvy vzorků. Tato změna byla způsobena přidavkem axilátu a jeho reakcí se solí tetrazolia. Protože se vzorky zabarvily do oranžova, nebylo možné naměřenými hodnotami absorbancí vypočítat cytotoxicitu způsobenou tímto typem nanoželeza.

4.8.5 Čtvrtý experiment

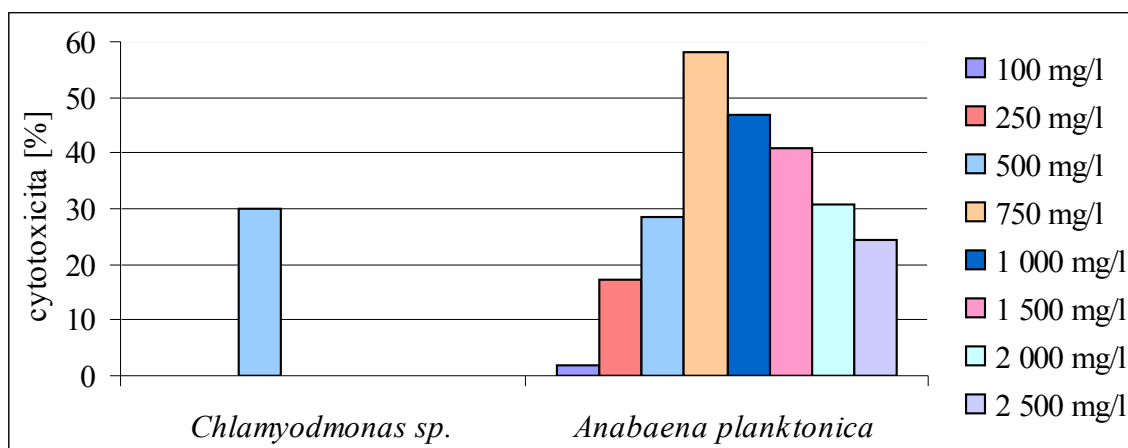
V první fázi čtvrtého cytotoxického testu byl zjišťován vliv nemodifikovaného nanoželeza na kulturu řasy *Chlamydomonas* sp. a sinice *Anabaena planktonica*. Parametry mikroorganismů byly stejné jako u předchozího testu. Předpokládaná koncentrace nanoželeza ve vzorcích s kulturou řasy *Chlamydomonas* byla 500 mg/l. Vliv nemodifikovaného nanoželeza na kulturu sinice *Anabaena* byl zjišťován pro koncentrace 100, 250, 500, 750, 1 000, 1 500, 2 000 a 2 500 mg/l. Množství nemodifikovaného nulemocného železa v suspenzi bylo analyzováno pomocí zmenšené aparatury Mašinovy trubice. Ve 40× ředěné suspenzi bylo obsaženo 65,2 % nulemocného železa. Dále byla měřena velikost částic nanoželeza v suspenzi pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS. Velikost částic byla 462,6 nm.

Bylo vytvořeno čtrnáct duplicitních vzorků. Kvůli malému množství zahuštěné kultury, použité v předchozím experimentu, byly vzorky připravovány v mikrozkušnicích. Do šesti mikrozkušnic bylo napipetováno 500 µl kultury *Chlamydomonas*. Do dvou z těchto zkumavek bylo napipetováno 100 µl suspenze nemodifikovaného nanoželeza a 400 µl demineralizované vody (vzorky D). Zbývající čtyři vzorky byly doplněny demineralizovanou vodou na objem 1 ml (vzorky A, B). Dále bylo do dvaceti mikrozkušnic napipetováno 500 µl kultury *Anabaena*. Vždy do dvou z těchto mikrozkušnic bylo přidáno 20 µl, 50 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl a 500 µl suspenze nanoželeza. Všechny vzorky byly doplněny demineralizovanou vodou na objem 1 ml (vzorky D). Do zbývajících čtyř vzorků bylo přidáno 500 µl demineralizované vody (vzorky A, B). Dále bylo do dvou mikrozkušnic napipetováno 500 µl kultivačního média a 500 µl demineralizované vody (vzorky C). Vzorky byly promíchávány v deseti minutových intervalech čtyřnásobným nasátím pipetou. Vzorky byly inkubovány po dobu tří hodin při laboratorní teplotě. Přesné koncentrace nemodifikovaného nanoželeza ve vzorcích jsou uvedeny v tabulce 4.8-3.

Tabulka 4.8-3: Koncentrace nanoželeza ve vzorcích

| Označení vzorku | Objem suspenze [μ l/1 ml] | Obsah celkového železa [mg/l] |
|-----------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 100 mg/l | 20 | 111,67 |
| 250 mg/l | 50 | 279,18 |
| 500 mg/l | 100 | 558,36 |
| 750 mg/l | 150 | 837,53 |
| 1 000 mg/l | 200 | 1116,71 |
| 1 500 mg/l | 300 | 1675,07 |
| 2 000 mg/l | 400 | 2533,43 |
| 2 500 mg/l | 500 | 2791,78 |

Testované vzorky byly připravovány a měřeny stejným postupem jako při druhém experimentu. Naměřené hodnoty absorbancí se pohybovaly mezi 0,059 až 0,220 Abs a jejich aritmetické průměry jsou uvedeny v příloze F (tabulka F-4). Z těchto hodnot byla pomocí rovnice (14) vypočítána procentuální cytotoxicita pro jednotlivé vzorky D. Tato cytotoxicita je vynesena v grafu 4.8-6.



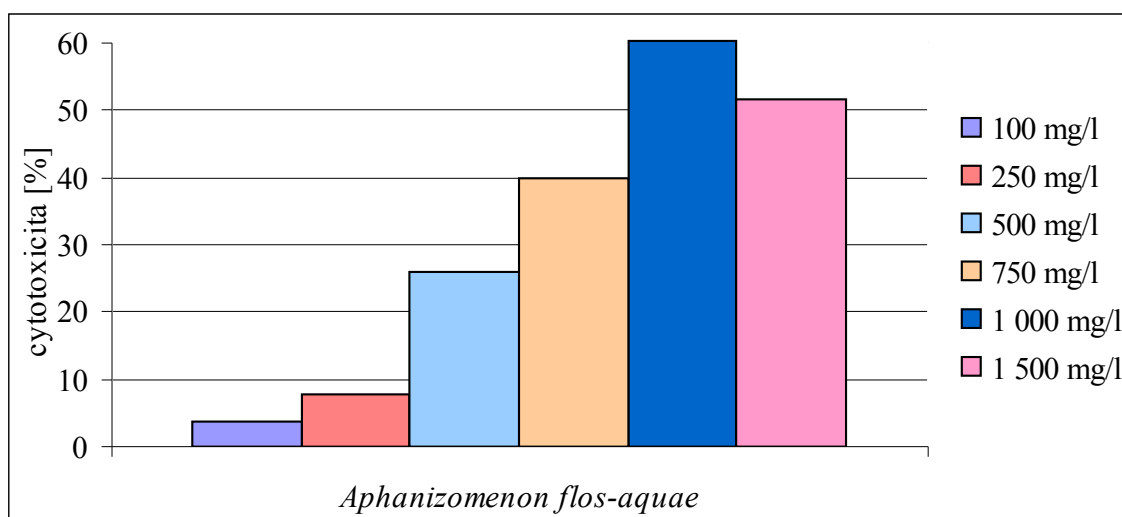
Graf 4.8-6: Vliv nemodifikovaného nulmocného nanoželeza na cytotoxicitu kultury *Chlamydomonas* a *Anabaena*

Z grafu 4.8-6 je patrné, že nemodifikované nulmocné nanoželezo je pro sinici *Anabaena* nejvíce toxické v koncentraci 837,5 mg/l. Při vyšších koncentracích dochází k agregaci nanoželeza a ke snížení jeho vlivu. Při nižších koncentracích je naopak účinek na sinici menší, kvůli nízkému obsahu nulmocného nanoželeza ve vzorcích a větší míře oxidace rozpuštěným kyslíkem než ve vzorcích s vyšší koncentrací nanoželeza. Cytotoxicita způsobená nemodifikovaným nanoželezem o koncentraci 558,4 mg/l je pro kulturu řasy *Chlamydomonas* i sinice *Anabaena* téměř stejná.

V druhé fázi tohoto experimentu byl zjišťován vliv nemodifikovaného nanoželeza na kulturu sinice *Aphanizomenon flos-aquae*. V kultuře bylo přítomno $1,8 \cdot 10^6$ buněk/ml. Předpokládaná koncentrace nanoželeza ve vzorcích byla 100, 250, 500, 750, 1 000 a 1 500 mg/l. Parametry nemodifikovaného nanoželeza byly stejné jako v první fázi tohoto experimentu.

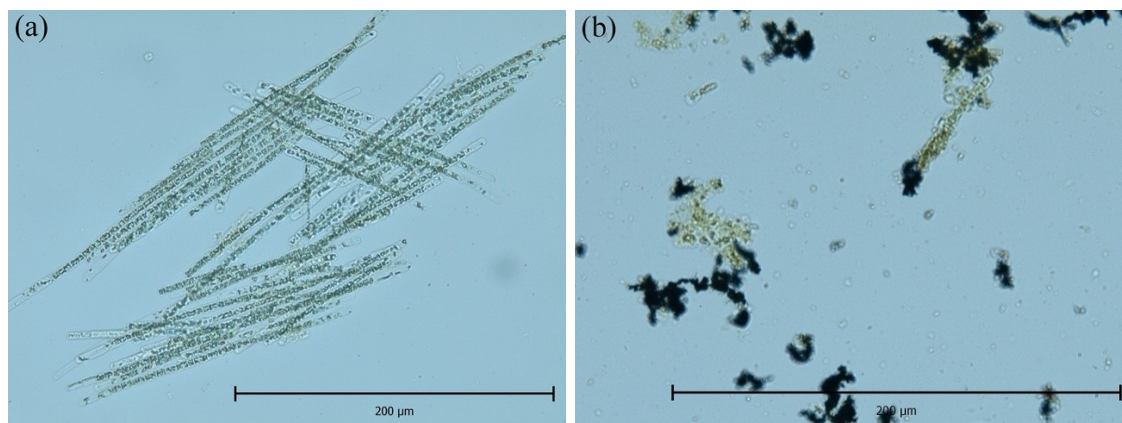
Bylo vytvořeno devět duplicitních vzorků. Do šestnácti mikrozkušavek bylo napipetováno 500 μ l kultury *Aphanizomenon*. Vždy do dvou z těchto mikrozkušavek bylo přidáno 20 μ l, 50 μ l, 100 μ l, 150 μ l, 200 μ l a 300 μ l suspenze nanoželeza. Všechny vzorky byly doplněny demineralizovanou vodou na objem 1 ml (vzorky D). Do zbývajících čtyř vzorků bylo napipetováno 500 μ l demineralizované vody (vzorky A, B). Dále bylo do dvou mikrozkušavek napipetováno 500 μ l kultivačního média a 500 μ l demineralizované vody (vzorky C). Vzorky byly promíchávány v desetiminutových intervalech čtyřnásobným nasátím pipetou. Vzorky byly inkubovány po dobu tří hodin. Přesná koncentrace nemodifikovaného nanoželeza byla totožná jako v první fázi tohoto experimentu a je uvedena v tabulce 4.8-3.

Testované vzorky byly připravovány a měřeny stejným postupem jako při druhém experimentu. Aritmetické průměry naměřených hodnot absorbancí jsou uvedeny v příloze F (tabulka F-5). Z těchto hodnot byla pomocí rovnice (14) vypočítána procentuální cytotoxicita pro jednotlivé vzorky D. Tato cytotoxicita je vynesena v grafu 4.8-7.



Graf 4.8-7: Vliv nemodifikovaného nulločného nanoželeza na cytotoxicitu kultury *Aphanizomenon*

Z grafu 4.8-7 je patrné, že nemodifikované nulmocné nanoželezo je pro sinici *Aphanizomenon* nejvíce toxické v koncentraci 1116,7 mg/l. Při nižších koncentracích nulmocného železa je účinek na sinici menší, kvůli nízkému obsahu nanoželeza ve vzorcích. Naopak při vyšších koncentracích dochází k agregaci nanoželeza a tím ke snížení jeho vlivu.



Obr. 4.8-3: Buněčný pelet sinice *Aphanizomenon flos-aquae*; [4]

Na obr. 4.8-3 (a) je vidět vzorek kultury sinice *Aphanizomenon flos-aquae* bez přidaného lyzačního roztoku, ze kterého byla zjištěna spontánní lyze buněk. Jak je vidět, vlákna sinice jsou bez poškození. Na obr. (b) je vidět vzorek, ke kterému bylo přidáno nulmocné nanoželezo v koncentraci 1116,7 mg/l. Je patrné, že ve vzorcích došlo k poškození vláken sinice a k prasknutí plazmatické membrány a k vylití obsahu buněk ven.

4.8.6 Zhodnocení

Pomocí cytotoxického testu lze určit vliv nemodifikovaného nulmocného nanoželeza na vybrané mikroorganismy. Při inkubaci je nutné zajistit kontinuální kontakt nulmocného nanoželeza s mikroorganismy a dostatečnou hustotu buněk.

Pomocí tohoto testu není možné zjistit vliv nanoželeza modifikovaného axilátem 32S. Přídavek axilátu způsobuje obarvení vzorků do oranžova. Toto obarvení se projeví při měření vzorků pomocí spektrofotometru zvýšenou hodnotou absorbance, která nemá žádný vztah k cytotoxicitě modifikovaného nulmocného nanoželeza. S vysokou pravděpodobností lze konstatovat, že tímto cytotoxickým testem nelze určovat ani vliv na mikroorganismy způsobený nulmocným nanoželezem modifikovaným axilátem 2435

(styren-akrylátový kopolymer), axilátem 32A (amonná sůl polyakrylové kyseliny), karboxymethylcelulózou, arabskou gumou či polyethylenglykolem. Všechny tyto látky jsou zkoumány na TUL v laboratoři chemických sanačních procesů jako možná modifikační činidla nanoželeza pro snížení agregace a všechny způsobují zabarvení vzorků.

4.9 Zjišťování vlivu nanoželeza měřením životaschopnosti buněk

Pro analýzu životaschopnosti buněčných kultur po aplikaci nulmocného nanoželeza byl využit přístroj Casy model TT. Měření tímto přístrojem je neinvazivní a nedochází při něm k toxickým účinkům barviv používaných při jiných metodách. Při průchodu buněk pórem kapiláry je generován proud, který neprochází membránou živých buněk a buněčným jádrem. Membrána mrtvých buněk je propustná pro elektrický proud. Změřenou velikostí buněčných jader a buněk lze od sebe odlišit poškozené nebo mrtvé buňky a životaschopné buňky.

Pro kulturu řasy *Chlamydomonas* sp. byla zvolena kapilára s velikostí póru 60 μm . Pro kalibraci (viz příloha C) byl vytvořen vzorek živých buněk z 200 μl kultury a 10 ml roztoku CASY TON. Bylo zjištěno, že velikost živých buněk se pohybuje od 4 do 11 μm .

Následně byl připraven vzorek s usmrcenými buňkami. Do nové kyvety bylo napipetováno 200 μl kultury a bylo přidáno 800 μl roztoku CASY BLUE. Vzorek byl inkubován po dobu dvou minut, poté byl naředěn 9 ml roztoku CASY TON. Po změření vzorku však nebyl pozorován pík mrtvých buněk. Podle návodu byl připraven nový vzorek, který byl inkubován deset minut. Poté byl naředěn a měřen, ale ani u tohoto vzorku nebyl pozorován kýžený pík. Buňky se podařilo usmrtit až pomocí 1 M roztoku chloridu sodného. K 200 μl kultury bylo napipetováno 800 μl roztoku NaCl a vzorek byl inkubován po dobu patnácti minut. Poté bylo ke vzorku přidáno 9 ml roztoku CASY TON, vzorek byl promíchán a měřen. Na grafickém displeji byl patrný pík mrtvých i živých buněk a bylo možné nastavit hodnoty normalizačních a vyhodnocovacích kurzorů. Mezi levým a pravým normalizačním kurzorem se nacházejí jak životaschopné tak mrtvé buňky a v intervalu vyhodnocovacích kurzorů se nacházejí pouze životaschopné buňky.

Při testech byla použita kultura stará devět až jedenáct dní od přeočkování. Hodnota levého normalizačního kurzoru byla nastavena na 2 μm , hodnota levého vyhodnocovacího kurzoru na 4,5 μm a hodnoty pravých kurzorů byly nastaveny na maximální hodnotu 40 μm . Kalibrace i následné měření probíhalo vždy ve třech měřicích cyklech a objem analyzovaného vzorku byl 200 μl .

Při kalibraci bylo zjištěno, že velikost buněk *Chlamydomonas* se v průběhu času mění. Po přeočkování se jejich velikost pohybuje mezi 4–8 μm . Po měsíci od očkování se velikost buněk pohybuje mezi 7–11 μm .

4.9.1 První experiment

Při prvním testu byl zkoumán vliv nemodifikovaného nulmocného nanoželeza ve třech koncentracích a ve čtyřech časových intervalech od počátku inkubace. Podíl nulmocného železa v 40 \times ředěné suspenzi analyzovaný pomocí zmenšené aparatury Mašínovy trubice byl 84,3 % a velikost částic nanoželeza v suspenzi měřená pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS byla 295 nm. Kultura *Chlamydomonas* nebyla při experimentech centrifugována. Koncentrace buněk v kultuře byla 7,4 \cdot 10⁵ buněk/ml.

Bylo vytvořeno osm duplicitních vzorků. Do všech šestnácti zkumavek bylo napipetováno 8 ml kultury. Do prvních čtyř zkumavek byly přidány 2 ml demineralizované vody. Dva z těchto vzorků byly slepé a sloužily jako kontrola. Do zbývajících dvou zkumavek byla přidána kyselina octová. Přidání 200 μl 0,01 M kyseliny octové k 10 ml kultury způsobí pokles pH na 6,5.

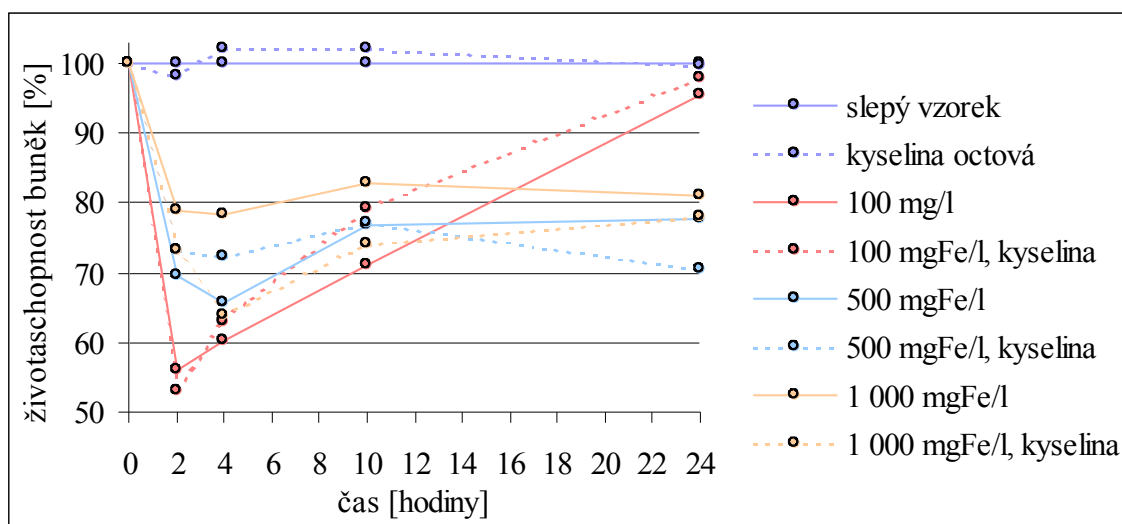
Do druhých čtyř zkumavek bylo napipetováno 0,2 ml ředěné suspenze nulmocného nanoželeza, do dalších čtyř zkumavek byl napipetován 1 ml ředěné suspenze nulmocného nanoželeza a do posledních čtyř zkumavek byly napipetovány 2 ml ředěné suspenze nulmocného nanoželeza. Přesné koncentrace nanoželeza ve vzorcích jsou uvedeny v tabulce 4.9.-1. Pro každou koncentraci nanoželeza bylo do dvou zkumavek přidáno 200 μl 0,01 M kyseliny octové a dva vzorky zůstaly bez přídavku kyseliny. Vzorky byly doplněny demineralizovanou vodou na objem 10 ml, aby byl ve všech vzorcích zachován stejný objem a stejná koncentrace buněk. Vzorky byly umístěny na vertikální rotační třepačku Plunotech s nulovou dobou zdržení

v krajních pozicích a s rychlostí otáčení pět otáček za minutu. Vzorky byly míchány po celou dobu testu při laboratorní teplotě.

Tabulka 4.9-1: Koncentrace nanoželeza ve vzorcích

| Označení vzorku | Objem suspenze [ml/10 ml] | Obsah celkového železa [mg/l] |
|-----------------|---------------------------|-------------------------------|
| 100 mg/l | 0,2 | 94,4 |
| 500 mg/l | 1 | 472 |
| 1 000 mg/l | 2 | 944 |

Před začátkem pokusu byla měřena životaschopnost buněk ve slepých vzorcích. Dále byly všechny vzorky měřeny po dvou, čtyřech, deseti a čtyřiaadvaceti hodinách od nasazení pokusu. Maximální délka pokusu by neměla přesáhnout jeden den, protože mikroorganismy jsou ve zkumavkách se šroubovacím uzávěrem a při delším čase by mohlo docházet k odumírání buněk z důvodu zamezení výměny plynů. Před začátkem pokusu bylo ve slepém vzorku přítomno 88 % životaschopných buněk.



Graf 4.9-1: Kinetika vlivu nulmocného nanoželeza na životaschopnost buněk kultury *Chlamydomonas*; Životaschopnost buněk v jednotlivých vzorcích byla přepočítána vzhledem slepému vzorku obsahujícímu 88 % životaschopných buněk.

Z grafu 4.9-1 je vidět, že přidavek kyseliny octové ke kultuře *Chlamydomonas* neovlivňuje životaschopnost buněk. Mírné kolísání životaschopnosti buněk ve vzorku s přidanou kyselinou je patrně způsobeno chybou měření. Ve všech ostatních vzorcích je vidět snížení životaschopnosti buněk po dvou hodinách inkubace.

Po přidání suspenze nanoželeza ke kultuře jsou buňky vystaveny dramatické změně prostředí. Zvýšená koncentrace nulmocného nanoželeza způsobuje generování

ROS v buňkách a vytvoření oxidačního stresu. Jak již bylo popsáno, buňky jsou schopny se s určitým zatížením vyrovnat. Koncentrace nulmocného železa 94,4 mg/l způsobuje oxidační stres, se kterým se buňky dokáží během čtyřiašesti hodin vypořádat. Skutečnost, že jsou buňky přístrojem vyhodnoceny jako mrtvé a v průběhu testu „oživnou“ může být způsobena tím, že buňky zatížené oxidačním stresem mohou mít částečně poškozenou buněčnou membránu. Tato je propustná pro elektrický proud a přístroj buňku nesprávně vyhodnotí jako mrtvou. V okamžiku, kdy je snížena koncentrace ROS v buněčném prostoru, přestává být membrána pro elektrický proud propustná a počet životaschopných buněk roste. Dalším vysvětlením by mohlo být přirozené dělení buněk, které zásah přežily. Nemodifikované nanoželezo je aktivní pouze několik desítek minut po aplikaci a v dalším čase je jeho vliv na buněčnou kulturu minimální. Nicméně toto vysvětlení „oživení kultury“ při experimentu nepřichází v úvahu. Po buněčném dělení jsou dceřiné buňky menší než mateřská a distribuční funkce rozložení velikosti buněk se posouvá doleva. Tato skutečnost nebyla při experimentu pozorována, tudíž nedocházelo k výraznému dělení buněk.

Ve vzorcích s nižší koncentrací nulmocného nanoželeza dochází k agregaci nanoželeza v nejmenší míře, a proto je patrně schopné ve vzorcích generovat více ROS a způsobit zdánlivě větší úmrtí buněk. „Oživení kultury“ vyvrcholilo po čtyřiašesti hodinách inkubace, kdy bylo ve vzorku bez přídavku kyseliny přítomno 95 % a v okyseleném vzorku 98 % životaschopných buněk.

U vyšších koncentrací přidaného nanoželeza (472 mg/l a 944 mg/l) je vidět podobný trend. Na počátku dochází k výraznému snížení životaschopnosti, následované mírnou regenerací kultury. Po desáté hodině je životaschopnost buněk konstantní. Množství životaschopných buněk se po desáté hodině pohybovalo mezi 74–83 % a po čtyřiašesté hodině bylo ve vzorcích přítomno 78–81 % životaschopných buněk. Zdá se, že přídavek kyseliny nemá na účinnost nanoželeza výrazný vliv.

4.9.2 Druhý experiment

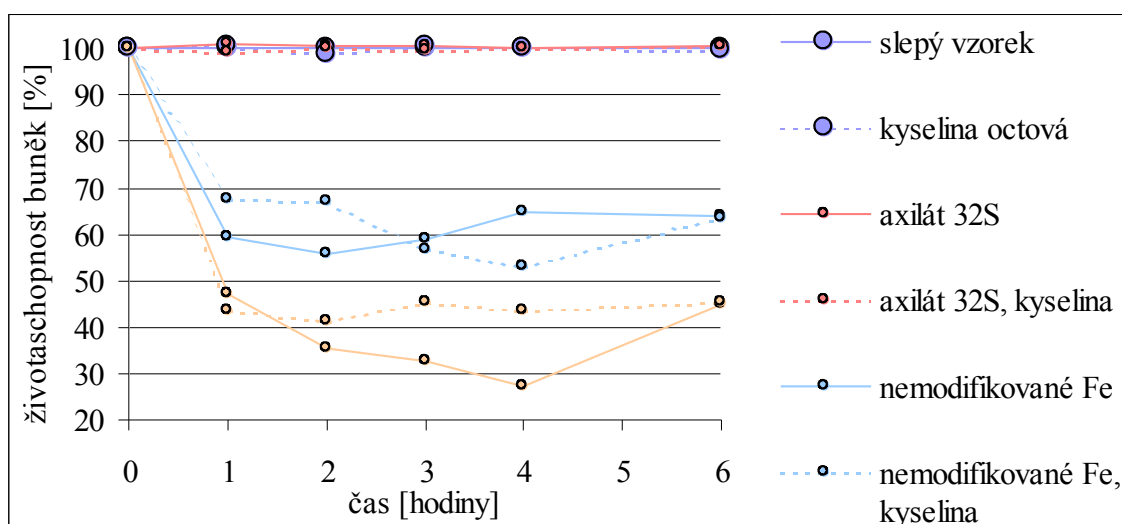
Při druhém testu byla zjišťována životaschopnost buněk *Chlamydomonas* po přidání modifikovaného a nemodifikovaného nanoželeza v prvních hodinách inkubace. Byla použita suspenze nemodifikovaného nulmocného nanoželeza a suspenze

nanoželeza modifikovaného axilátem 32S. 40× ředěné suspenze byly analyzovány pomocí zmenšené aparatury Mašinovy trubice. V nemodifikované suspenzi bylo obsaženo 76,8 % a v axilátové suspenzi bylo obsaženo 84,0 % nulmocného železa. Velikost částic nanoželeza v suspenzi, měřené pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS, byla u nemodifikovaných částic 126,0 nm a u modifikovaných částic 45,6 nm. Koncentrace buněk v kultuře *Chlamydomonas* byla $5,5 \cdot 10^5$ buněk/ml.

Bylo vytvořeno osm duplicitních vzorků. Do všech 16 zkumavek bylo napipetováno 9 ml kultury. Do prvních čtyř zkumavek byl přidán 1 ml demineralizované vody. Dva z těchto vzorků byly slepé, do dalších dvou zkumavek bylo přidáno 200 µl 0,01 M kyseliny octové. Do druhých čtyř zkumavek byl přidán 1 ml suspenze axilátu 32S bez nulmocného nanoželeza. Z těchto vzorků byl zjišťován vliv samotného axilátu na *Chlamydomonas*, respektive vliv axilátu a kyseliny.

Do dalších čtyř zkumavek byl přidán 1 ml suspenze nemodifikovaného nulmocného nanoželeza. Koncentrace nanoželeza v těchto vzorcích byla 820,45 mg/l. Do posledních čtyř zkumavek byl přidán 1 ml suspenze modifikovaného nulmocného nanoželeza. Koncentrace axilátového nanoželeza ve vzorcích byla 491,32 mg/l. Pro oba typy nanoželeza bylo vždy do dvou ze čtyř zkumavek přidáno 200 µl kyseliny octové. Vzorky byly umístěny na vertikální rotační třepačku Plunotech s nulovou dobou zdržení v krajních pozicích a s rychlostí otáčení pět otáček za minutu. Vzorky byly míchány po celou dobu testu při laboratorní teplotě.

Životaschopnost buněk byla měřena ve slepých vzorcích před začátkem pokusu. Dále byly všechny vzorky měřeny po jedné, dvou, třech, čtyřech a šesti hodinách od nasazení pokusu. Tyto intervaly byly voleny pro zjištění vývoje vlivu nanoželeza na řasu *Chlamydomonas* v počáteční fázi inkubace. Před začátkem pokusu bylo ve slepém vzorku přítomno 92 % životaschopných buněk.



Graf 4.9-2: Kinetika vlivu nemodifikovaného nanoželeza a nanoželeza modifikovaného axilátem 32S na životaschopnost buněk kultury *Chlamydomonas*; Životaschopnost buněk v jednotlivých vzorcích byla přepočítána vzhledem slepému vzorku obsahujícímu 92 % životaschopných buněk.

Z grafu 4.9-2 je patrné, že přidavek kyseliny, axilátu 32S ani axilátu 32S s kyselinou neovlivňuje životaschopnost buněk. Dále pak, že pro buněčnou kulturu *Chlamydomonas* je více toxické nanoželezo modifikované axilátem než nemodifikované při stejné koncentraci. K největšímu poklesu životaschopnosti buněk dochází po první hodině působení nanoželeza. Snížení pH kyselinou octovou nemá na toxicitu nanoželeza prokazatelný vliv, stejně jako u předchozího experimentu.

4.9.3 Třetí experiment

Třetí test byl zaměřen na zkoumání vlivu nemodifikovaného a modifikovaného nanoželeza a prototypu nulmocného železa v různých koncentracích. Při testu byla použita suspenze nemodifikovaného nulmocného nanoželeza, suspenze nanoželeza modifikovaného axilátem 32S a suspenze nulmocného železa μ ZVI. Parametry nemodifikovaného a modifikovaného nulmocného nanoželeza byly stejné jako v předchozím experimentu.

Suspenze nulmocného železa μ ZVI nebyla připravována klasickým dispergováním. Bylo naváženo 400 mg železa a přidáno 80 ml demineralizované vody. Dispergace probíhala v ultrazvukové lázni po dobu dvaceti minut. Podíl nulmocného

železa v suspenzi analyzovaný pomocí zmenšené aparatury Mašínovy trubice byl 91,8 % a velikost dispergovaných μ ZVI částic v suspenzi, měřená pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS byla 255,7 nm. Koncentrace buněk v kultuře *Chlamydomonas* byla $6,4 \cdot 10^5$ buněk/ml.

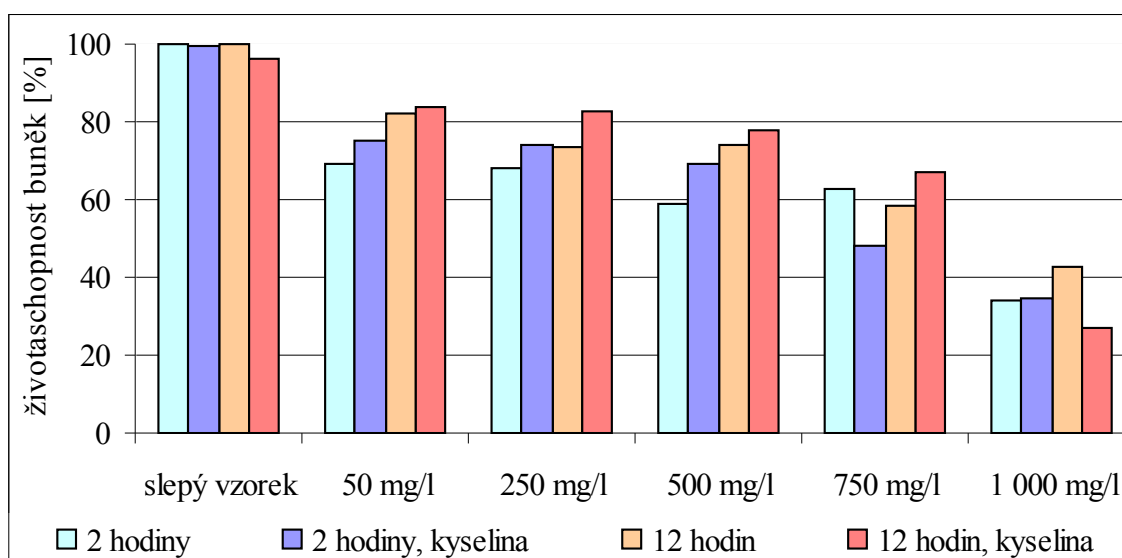
Bylo vytvořeno 32 duplicitních vzorků. Do všech 64 zkumavek bylo napipetováno 8 ml kultury. Do prvních čtyř zkumavek byly přidány 2 ml demineralizované vody. Dva z těchto vzorků byly kontrolní a do zbylých dvou bylo přidáno 200 μ l 0,01 M kyseliny octové. Zbylých 60 zkumavek bylo rozděleno na tři skupiny po dvaceti. Vždy do čtyř zkumavek z každé skupiny bylo přidáno 0,1 ml, 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml a 2 ml příslušné suspenze nanoželeza. Všechny vzorky byly doplněny demineralizovanou vodou na objem 10 ml. Pro všechny tři typy nanoželeza bylo vždy do dvou ze čtyř příslušných zkumavek přidáno 200 μ l 0,01 M kyseliny octové. Přesné koncentrace nanoželeza v jednotlivých vzorcích jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 4.9-2: Koncentrace nanoželeza ve vzorcích

| Označení vzorku | Objem suspenze [ml/10 ml] | Obsah celkového železa [mg/l] | | |
|-----------------|---------------------------|-------------------------------|-----------|-----------|
| | | nemodifikované | μ ZVI | axilátové |
| 50 mg/l | 0,1 | 82,05 | 50 | 49,13 |
| 250 mg/l | 0,5 | 410,23 | 250 | 245,66 |
| 500 mg/l | 1 | 820,45 | 500 | 491,32 |
| 750 mg/l | 1,5 | 1230,68 | 750 | 736,98 |
| 1 000 mg/l | 2 | 1640,91 | 1000 | 982,63 |

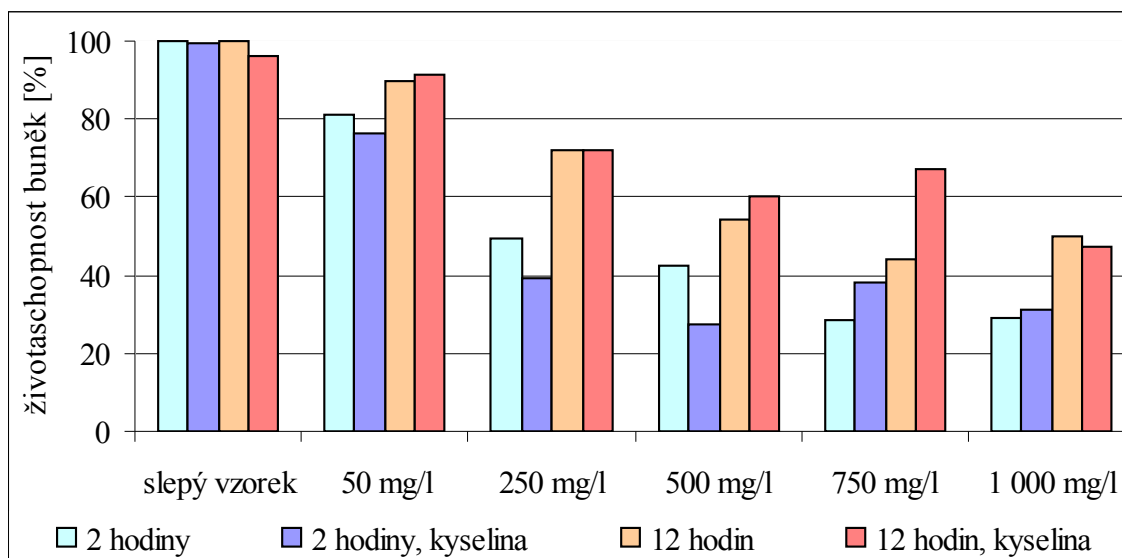
Vzorky byly nasazovány ve čtyřech fázích po 30 minutách, aby bylo možno zajistit stejnou dobu inkubace. Vzorky byly umístěny na vertikální rotační třepačku Plunotech s nulovou dobou zdržení v krajních pozicích a s rychlostí otáčení pět otáček za minutu. Vzorky byly míchány po celou dobu testu při laboratorní teplotě.

Životaschopnost buněk byla před začátkem pokusu měřena ve slepých vzorcích. Dále byly všechny vzorky měřeny po dvou a po dvanácti hodinách od nasazení pokusu. Před začátkem pokusu bylo ve slepém vzorku přítomno 96 % životaschopných buněk.



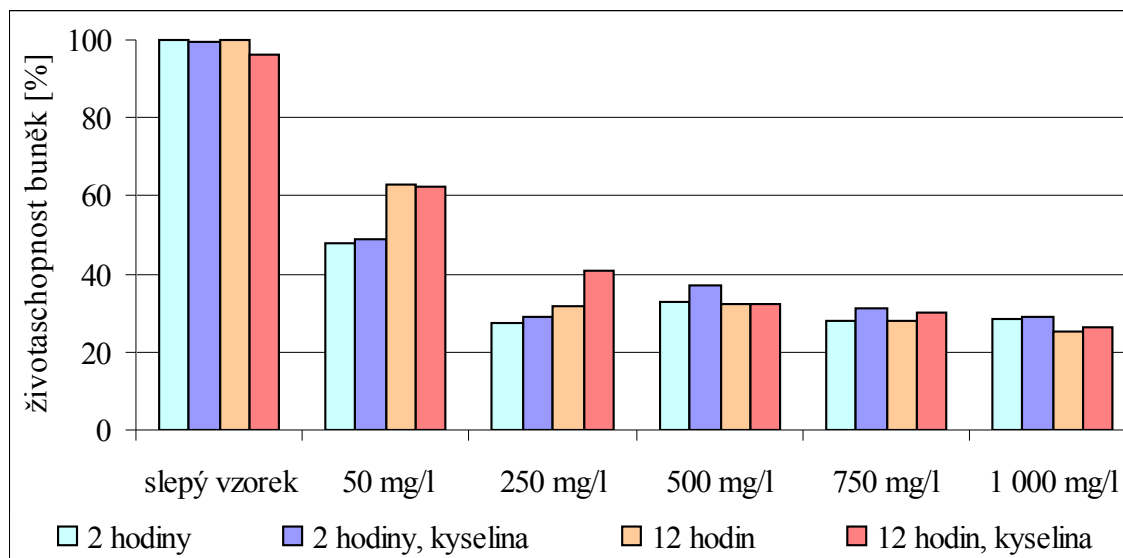
Graf 4.9-3: Vliv nemodifikovaného nulmocného nanoželeza na životaschopnost buněk kultury Chlamydomonas; Životaschopnost buněk v jednotlivých vzorcích byla přepočítána vzhledem slepému vzorku obsahujícímu 96 % životaschopných buněk.

Z grafu 4.9-3 je patrné, že přidavek kyseliny ve vzorku nemá na životaschopnost buněk významný vliv. Dále pak, že vyšší koncentrace přidaného nanoželeza byla pro buňky více toxická. Po dvanácti hodinách došlo k mírnému zvýšení životaschopnosti buněk u většiny vzorků. Nemodifikované nanoželezo způsobovalo ve srovnání s ostatními testovanými suspenzemi nejmenší snížení životaschopnosti.



Graf 4.9-4: Vliv μ ZVI nulmocného železa na životaschopnost buněk kultury Chlamydomonas; Životaschopnost buněk v jednotlivých vzorcích byla přepočítána vzhledem slepému vzorku obsahujícímu 96 % životaschopných buněk.

Suspenze vyrobená z μ ZVI nulmocného železa (graf 4.9-4), způsobovalo vyšší úmrtnost buněk než suspenze nemodifikovaného nanoželeza. Také u těchto vzorků došlo po dvanácti hodinách ke zvýšení životaschopnosti buněk a vyšší koncentrace nanoželeza způsobovala větší úmrtnost buněk.



Graf 4.9-5: Vliv nulmocného nanoželeza modifikovaného pomocí axilátu 32S na životaschopnost buněk kultury Chlamydomonas; Životaschopnost buněk v jednotlivých vzorcích byla přepočítána vzhledem slepému vzorku obsahujícímu 96 % životaschopných buněk.

Suspenze nanoželeza modifikovaného axilátem 32S (graf 4.9-5) byla pro kulturu Chlamydomonas nejvíce toxická. Po dvanácti hodinách došlo ke zregenerování buněk pouze ve vzorku s koncentrací nanoželeza 50 mg/l. U ostatních vzorků nedošlo ke zpětnému „oživení“ buněk. Míra životaschopnosti ve vzorcích s koncentrací nulmocného nanoželeza 250–1 000 mg/l se výrazně nelišila. Modifikované nanoželezo zůstává oproti nemodifikovanému redoxně aktivní po delší dobu, a proto nedovoluje regeneraci buněk.

4.9.4 Zhodnocení

Použitím přístroje Casy model TT lze zjišťovat vliv nemodifikovaného i modifikovaného nulmocného nanoželeza na řasu Chlamydomonas. Při analyzování není nutná zvýšená hustota buněk. Naopak při měření je nutné kulturu naředit tak, aby počet buněk v naředěném vzorku menší než 10^5 buněk/ml.

Touto metodou nebyl analyzován vliv nulmocného nanoželeza na sinice *Anabaena planktonica* a *Aphanizomenon flos-aquae*, neboť jako prokaryotní organismy nemají pravé buněčné jádro a jejich kruhová DNA se volně pohybuje v cytoplazmě. Přístroj tudíž nemůže žádné jádro identifikovat a je vyhodnocován pouze počet živých buněk a buněčné zbytky ve vzorku. Vliv nulmocného nanoželeza na sinice by mohl být zjišťován pomocí těchto dvou hodnot. Vzorky by však musely být připravovány ve více vyhotoveních, aby byla snížena možnost chybné interpretace způsobená menším počtem buněk v analyzovaném vzorku. Dalším problémem při analyzování životaschopnosti sinic tímto přístrojem je skutečnost, že přístroj vyhodnocuje vlákno jako jednu buňku o určité velikosti a maximální délka vlákna nesmí přesáhnout 120 μm . Tudíž je nutné vlákna rozbít na jednotlivé buňky, aniž by se poškodila jejich buněčná membrána.

4.10 Zjišťování vlivu nanoželeza pomocí fluorochromu

Při fluorescenčních testech byl zkoumán oxidační stres způsobený nulmocným nanoželezem pomocí fluorochromu Total ROS Detection Kit firmy Enzo Life Science (viz příloha D). Pro detekci fluorochromu byl použit fluorescenční mikroskop Zeiss Axio Imager A1.

Při fluorescenčním experimentu byl zkoumán vliv nulmocného nanoželeza modifikovaného axilátem 32S na kulturu sinice *Anabaena planktonica*. V kultuře bylo $4,3 \cdot 10^5$ buněk/ml. Předpokládaná koncentrace nanoželeza ve vzorcích byla 500 mg/l. Množství nulmocného železa v $40\times$ ředěné suspenzi, analyzované pomocí zmenšené aparatury Mašinovy trubice, bylo 84,0 % a velikost modifikovaných částic měřená přístrojem Zetasizer Nano ZS, byla 45,6 nm.

Byly vytvořeny dva vzorky. Do dvou zkumavek bylo napipetováno 9 ml kultury *Anabaena*. Do jedné z zkumavek byl přidán 1 ml suspenze modifikovaného nanoželeza. Přesná koncentrace nanoželeza byla 491,32 mg/l. Do druhé zkumavky byl přidán 1 ml demineralizované vody. Vzorky byly umístěny na vertikální rotační třepačku Plunotech s nulovou dobou zdržení v krajních pozicích a s rychlostí otáčení pět otáček za minutu. Vzorky byly míchány po dobu dvou hodin při laboratorní teplotě.

Po skončení inkubace bylo podle návodu do tří centrifugačních zkumavek napipetováno 250 μl slepého vzorku (testovaný slepý vzorek, pozitivní a negativní

kontrola) a do jedné zkumavky 250 µl vzorku inkubovaného s nanoželezem (testovaný vzorek). Všechny čtyři vzorky byly centrifugovány při 1 9000 otáčkách za minutu po dobu pěti minut. Po centrifugaci byl odlit supernatant a buněčný pelet byl resuspendován 200 µl roztoku ROS Detection Solution. Vzorky byly inkubovány jednu hodinu v šeru s opakovaným promícháváním po patnácti minutách. Po 30 minutách inkubace byly ke vzorku negativní kontroly přidány 3 µl roztoku ROS Inhibitor. Po inkubaci byly všechny čtyři vzorky centrifugovány a byl odlit supernatant. Buněčný pelet byl resuspendován 5 ml roztoku Wash Buffer Salts, vzorky opět byly centrifugovány a supernatant byl odlit pro odstranění fluorochromu. Ke vzorku pozitivní kontroly bylo přidáno 5 µl roztoku ROS Inducer a vzorek byl inkubován po dobu 30 minut. Poté byl tento vzorek centrifugován, supernatant odlit a buněčný pelet byl resuspendován 5 ml roztoku Wash Buffer Salts. Následně byl vzorek opět centrifugován a supernatant odlit. Všechny čtyři vzorky byly resuspendovány 100 µl roztoku Wash Buffer Salts.

Poté bylo na podložní sklíčko napipetováno 20 µl vzorku a preparát byl pozorován fluorescenčním mikroskopem při použití filtru s excitací 550 nm a emisí 620 nm pro detekci sekundárního fluorochromu (ROS Detection Solution) a při použití filtru s excitací 450 nm a emisí 680 nm pro detekci primárního fluorochromu (chlorofylu).

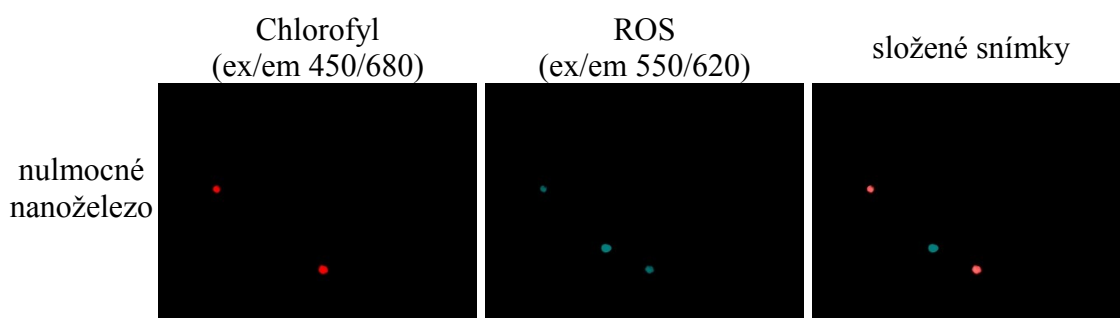
Během pokusu došlo při centrifugaci a odlévání supernatantu k vyplavení většiny buněčného materiálu a v preparátech se nenacházely téměř žádné buňky. Vlákná sinice *Anabaena* obsahují aerotopy, které jí dovolují vznášet se ve vodním sloupci a znesnadňují centrifugaci. Proto byla při druhém testu použita kultura řasy *Chlamydomonas*.

Při druhém experimentu bylo testováno modifikované nanoželezo a jeho vliv na kulturu *Chlamydomonas* sp. V kultuře bylo $6,2 \cdot 10^5$ buněk/ml. Parametry nanoželeza byly stejné jako u předcházejícího experimentu. Inkubace vzorků probíhala stejným způsobem jako v předchozím experimentu a doba inkubace byla zkrácena na jednu hodinu. Při samotném experimentu byly vzorky reseuspendovány WC-médiem a poslední resuspendování vzorků nebylo provedeno, aby nedošlo k přilišnému naředění zkoumaného vzorku.

Po provedení experimentu bylo na podložní sklíčko napipetováno 20 μ l vzorku a preparát byl pozorován fluorescenčním mikroskopem. Při použití filtru s excitací 550 nm a emisí 620 nm pro detekci ROS Detection Solution byly patrné buňky obsahující ROS ve vzorcích s přidaným nanoželezem a ve vzorku pozitivní kontroly. Ve vzorku pozitivní kontroly nebyly patrné buňky, které by neobsahovaly ROS. Fluorochrom používaný při tomto testu emituje oranžové světlo.

Pro detekci všech buněk byl použit filtr s excitací 450 nm a emisí 680 nm, kterým je v buňkách zvýrazněn chlorofyl emitující červené světlo.

Při skládání fotografií bylo oranžové zbarvení fluorochromu navázaného na ROS změněno na zelenou, neboť po složení červené a oranžové barvy není patrný rozdíl mezi buňkami, které obsahují respektive neobsahují zvýšené množství ROS.



Obr. 4.10-1: Buňky kultury *Chlamydomonas* [5]

Z obr. 4.10-1 je patrné, že buňky ve vzorku s přidaným nulmocným nanoželezem (c) byly vystaveny působení ROS generovaných nanoželezem. Ve slepém vzorku bylo přítomno minimální množství ROS, které je vždy přítomno v buňkách jako vedlejší produkt aerobního dýchání. Ve vzorku pozitivní kontroly bylo v buňkách obsaženo také velké množství ROS, kdežto ve vzorku negativní kontroly bylo přítomno minimální množství ROS.

Závěr

Studie zabývající se toxicitou nulmocného nanoželeza na sinice a řasy nebyly doposud nikde publikovány. Při studiu toxicity nanoželeza je zapotřebí překonat mnoho metodologických překážek jako je rychlá oxidace nulmocného nanoželeza v přítomnosti kyslíku a tendence tvorby agregátů při vyšším pH.

Byly modifikovány a ověřovány tři vybrané metody, které mají odlišný princip detekce vlivu nulmocného nanoželeza na životaschopnost vybraných mikroorganismů.

První z nich kvantitativně měří enzym LDH, který je uvolňován při lyzi buněk. Při prasknutí plazmatické membrány, a následném vylití cytosolu a organel ven z buňky, je spektrofotometricky měřen červený produkt vzniklý reakcí LDH se solí tetrazolia. Touto metodou je možné analyzovat vliv nemodifikovaného nanoželeza. Nanoželezo modifikované axilátem 32S způsobovalo zabarvení vzorků a jejich naměřené absorbance neměly žádnou vypovídající hodnotu. Metoda je vhodná pro všechny typy zkoumaných mikroorganismů, nicméně je zapotřebí, aby bylo ve vzorcích přítomno dostatečné množství buněk.

Druhou metodou zjišťování vlivu nulmocného nanoželeza na mikroorganismy bylo použití přístroje Casy model TT, který určuje životaschopnost buněk vyhodnocováním jejich velikostí. Neporušená membrána životaschopných buněk není propustná pro elektrický proud a změřená velikost je skutečnou velikostí buňky. Membrána mrtvé buňky je pro elektrický proud propustná a změřená velikost odpovídá velikosti buněčného jádra. Tímto způsobem lze přesně zjistit počty životaschopných a mrtvých buněk. Metoda je vhodná pro všechny typy suspenzí nulmocného nanoželeza, avšak lze jí důvěryhodně analyzovat především eukaryotické organismy.

Při třetí metodě byl využíván kit pro detekci ROS v buňkách mikroorganismů a fluorescenční mikroskop. Tato metoda je vhodná pro všechny typy suspenzí nulmocného nanoželeza. Metodou lze, při vhodné volbě excitačních a barierových filtrů, analyzovat vliv nulmocného nanoželeza na generování ROS v eukaryotických i prokaryotických mikroorganismech na buněčné úrovni.

Srovnáme-li tyto tři metody z finančního hlediska, pak je nejlevnější cytotoxický test, jehož cena je 10 000Kč a při provádění testu je zapotřebí pouze spektrofotometr. Zjišťování toxicity pomocí přístroje Casy model TT je finančně

náročnější, neboť pořizovací cena přístroje je 750 000 Kč, naopak použité chemikálie jsou levné. Nejvíce finančně náročná je metoda analýzy využívající fluorescenční mikroskop a kit pro detekci ROS, pořizovací cena mikroskopu se pohybuje mezi 1–1,5 mil Kč a cena detekčního kitu je 5 500 Kč. Z hlediska ceny jednoho stanovení bez ohledu na přístrojové vybavení je nejdražší metodou cytotoxický test (zhruba 200 Kč za vzorek), další dvě metody jsou výrazně levnější (zhruba 2 Kč za vzorek). Časová náročnost provedení cytotoxického testu a analýzy životaschopnosti a následné vyhodnocení naměřených hodnot je srovnatelná. Časově mnohem náročnější je metoda využívající fluorescenční mikroskop, pokud jsou výsledky vyhodnocovány analýzou obrazu.

Z výsledků provedených experimentů vyplývá, že pro testovanou kulturu řasy *Chlamydomonas* sp. je nejvíce toxické nulmocné nanoželezo modifikované axilátem 32S. Koncentrace nulmocného modifikovaného nanoželeza 245,7 mg/l způsobuje úmrtí 70,9 % buněk v kultuře. Pro kulturu sinice *Anabaena planktonica* je nemodifikované nanoželezo nejvíce toxické v koncentraci 837,5 mg/l a pro kulturu *Aphanizomenon flos-aquae* způsobuje největší toxicitu v koncentraci 1 116,7 mg/l.

Metody pro zjišťování vlivu nanoželeza na sinice a řasy a způsoby inkubace bylo nutné po prvních experimentech modifikovat a experimenty znovu opakovat. Při experimentech bylo zapotřebí zajistit malou velikost nanočástic nulmocného železa, proto byly testovány látky snižující pH a zajišťující menší a stabilní velikost (fosfátový pufr a kyseliny). Dále bylo nutné minimalizovat množství kyslíku rozpuštěného ve vodě a snížit tak míru oxidace nulmocného nanoželeza aniž by byl ovlivněn růst mikroorganismů.

Při laboratorních experimentech byla používána méně koncentrovaná suspenze nulmocného nanoželeza, kterou nebylo možné analyzovat pomocí komerčně dodávané Mašínovy trubice. Proto byla zkonstruována zmenšená aparatura, díky níž je možné analyzovat i suspenze s malým podílem nulmocného železa.

Výše popsané experimenty jsou výchozím bodem pro další testování toxicity nanoželeza pro mikroorganismy. Bude zjišťována závislost množství generovaných ROS na koncentraci a různých modifikacích nulmocného nanoželeza a s tím spojená míra oxidačního stresu.

Použitá literatura

- [1] LEE, Robert Edward. Phycology. 4th ed. New York: Cambridge University Press, 2008. 547 p. ISBN 978-0-521-86408-4, ISBN 978-0-521-68277-0.
- [2] KAŠTOVSKÝ, Jan; HAUER, Tomáš; LUKAVSKÝ, Jaromír. Sinice a řasy: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Přírodovědecká fakulta [online]. České Budějovice: 2003 [cit. 2011-04-18]. Dostupné z WWW: <<http://www.sinicearasy.cz/>>.
- [3] Komárek, J.; Anagnostidis, K.. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4 - Nostocales. 1989. Arch Hydrobiol Suppl 82, 247–345.
- [4] Foto: Kateřina ŠIMONOVÁ - optický mikroskop Olympus BX51M
- [5] Foto: Kateřina ŠIMONOVÁ - fluorescenční mikroskop Zeiss Axio Imager A1
- [6] Česká Republika. Zákon č. 258/2000 Sb. O ochraně veřejného zdraví a související předpisy. Sbírka zákonů. 2000, částka 75, Vyhláška č. 135/2004 Sb. kterou se stanoví hygienické požadavky na koupaliště, sauny a hygienické limity písku v pískovištích venkovních hracích ploch se změnami 292/2006 Sb., s. 2558-2639.
- [7] Povodí Moravy, s. p.: Výskyt sinic na území Povodí Moravy, s. p. [online]. Brno: srpen 2006 [cit. 2011-04-18]. Dostupné z WWW: <http://web.pmo.cz/tis_zpr_0611.asp>.
- [8] AMBROŽOVÁ, J. Aplikovaná a technická hydrobiologie. Praha: VŠCHT Praha, 2003. Dostupné z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-521-8/pdf/071.pdf>. ISBN 80-7080-521-8.
- [9] ZNACHOR, Petr. Akvárium zal. 1899: bývalý První spolek přátel akvárií a terárií v Království Českém v Praze [online]. Praha: 1.2.2005 [cit. 2011-04-18]. Skutečnost a mýty o sinicích a vodním květu. Dostupné z WWW: <<http://www.akvarium.cz/1899/pages/text/recent/dalsi/sinice/sinice.htm>>.
- [10] ZNACHOR, Petr. Vodní květy řas a sinic. Scientific American České vydání. 2005, červenec, s. 42-51. Dostupný také z WWW: <http://www.fytoplankton.cz/doc/Vodni_kvety.pdf>.
- [11] PADAN, Etana; SHILO, Moshe. Cyanophages: Viruses Attacking Blue-Green Algae. Bacteriological Reviews: American Society for Microbiology. Sept. 1973, vol. 37, no. 3, s. 343-370.

- [12] MIHULKA, Stanislav. Objective Source E-Learning [online]. 17.06.2009 [cit. 2011-04-18]. Ultrazvukovou zbraní na vodní květ. Dostupné z WWW: <<http://www.osel.cz/index.php?clanek=4468>>.
- [13] BARSANTI, Laura; GUALTIERI, Paolo. Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology. 1st ed. New York: CRC Press, 2006. 301 p. ISBN 978-0-8493-1467-4.
- [14] CORNELIS, P.; ANDREWS, S. C. . Iron uptake and homeostasis in microorganism. Caister Academic Press, 2010. 300 p.
- [15] ANDERSEN, R. A. . Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press, 2005. 579 p.
- [16] CAPPUCCINO, James G.; SHERMAN, Natalie. Microbiology: A Laboratory Manual. 9th ed. San Francisco: Pearson Education, 2008. 544 s. ISBN 978-0-321-65133-4.
- [17] ČERNÍK, Miroslav, et al. Chemický podporované in-situ sanační technologie. 1. vydání. Praha: VŠCHT Praha, 2010. 348 s. ISBN 978-80-7080-767-5.
- [18] DE VICENTE, Inmaculada, et al. On the use of magnetic nano and microparticles for lake restoration. Journal of Hazardous Materials. September 2010, vol. 181, p. 375-381. Dostupný také z WWW: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B6TGF-50297MS-C-8&_cdi=5253&_user=640831&_pii=S0304389410006011&_origin=gateway&_coverDate=09%2F15%2F2010&_sk=998189998&view=c&wchp=dGLbVtb-zSkzk&md5=8fec63aac7acd64491c3e546ca564203&ie=/sdarticle.pdf>.
- [19] LIEN, H. L.; ZHANG, W. Nanoscale iron particles for complete reduction of chlorinated ethens: Colloid Surface A.. 2001.
- [20] Kompendium sanačních technologií. Vít Matějů, Olga Halousková. Vydání 1. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor, 2006. 255 s. ISBN 80-86832-15-5.
- [21] Univerzita Palackého v Olomouci [online]. 07/2010 [cit. 2011-04-18]. Dostupné z WWW: <<http://www.biochemie.upol.cz/vyzk.php?lang=cs>>.
- [22] ŠEVČŮ, A. Toxicological Screening of Activated NPs Suitable for Water Treatment Applications: Oxidative Stress in Microorganisms Exposed to Iron Nanoparticles. Liberec, 2009. 34 p. Interní dokument projektu NAMETECH. Technická univerzita v Liberci.

- [23] Nanoiron Future Technology [online]. 2008 [cit. 2011-04-18]. Dostupné z WWW: <<http://nanoiron.cz/>>.
- [24] DAVIES, K. J. A. Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. IUBMB Life, 2000, 50p. 279–289.
- [25] AUFFAN, Mélanie. Relation between the Redox State of Iron-Based Nanoparticles and Their Cytotoxicity toward Escheria coli. Environmental Science & Technology. 2008, vol. 42, no. 17, p. 6730-6735. Dostupný také z WWW: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021%2Fes800086f>>.
- [26] Laboratoř ekologie fytoplanktonu [online]. Hydrobiologický ústav Akademie věd České republiky , 2001 [cit. 2011-04-18]. Sbírka sinic. Dostupné z WWW: <<http://www.fytoplankton.cz/sbirka-sinic/show.php?show=8>>.
- [27] Foto: Kateřina ŠIMONOVÁ - fotoaparát Olympus FE-280
- [28] Příručka pro uživatele MAN0317. Zetasizer Nano. Velká Británie: Malvern Instruments, leden 2007. 197 s.
- [29] Technical Bulletin - TB163. CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay: INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCT G1780. Madison (USA): Promega Corporation, March 2009. 18 s. Dostupné z WWW: <<http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/CytoTox%20NonRadioactive%20Cytotoxicity%20Assay%20Protocol.ashx>>.
- [30] Operator Manual 2.3E. CASY® Cell Counter + Analyser System Model TT. Reutlingen (Germany) : Roche Innovatis AG, April 2002. 47 p. Dostupné z WWW: <<http://www.ibgm.med.uva.es/files/upload/manual//casyoperatormanual.pdf>>.
- [31] Instruction Manual Cat. No. ENZ-51011. Total ROS Detection Kit: for fluorescence microscopy and flow cytometry. [s.l.]: Enzo Life Sciences, November 2010. 16 p. Dostupné z WWW: <http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/files/manual/User_Manual-ENZ-51011_-_Rev_2.0.2_Nov_2010.pdf>.
- [D-1] ČERNÝ, Jan. Oddělení vývojové biologie : Katedra fyziologie živočichů [online]. Praha: Přírodovědecká fakulta UK v Praze, [cit. 2011-04-19]. Fluorescenční mikroskopie. Dostupné z WWW: <<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/Biolog/3cerny.pdf>>.

- [D-2] SÝKORA, Jan. Oddělení biofyzikální chemie [online]. 2008 [cit. 2011-04-19]. Fluorescenční mikroskopie a fluorescenční korelační spektroskopie jako nástroje pro měření velikosti a pohyblivosti nanočástic. Dostupné z WWW:<http://www.jh-inst.cas.cz/3nastroje/data/dokument/soubor/Sbornik_Sykora_prednaska_LS2008.pdf>.
- [D-3] Laboratorní cvičení z obecné mikrobiologie [online]. [cit. 2011-04-19]. Mikroskopy. Dostupné z WWW: <http://webak.upce.cz/~kbbv/Student/Vyuka/Obecna_klinicka_mikrobiologie/Laboratorni_cviceni/Navody/Mikroskopy.pdf>.
- [D-4] Univerzita Palackého v Olomouci [online]. [cit. 2011-04-19]. Luminiscence a fluorescence. Dostupné z WWW: <http://fch.upol.cz/skripta/zfcm_pred/3_luminiscence.pdf>.
- [D-5] Vysoká škola chemicko-technologická v Praze [online]. [cit. 2011-04-19]. Fluorescenční mikroskopie. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/homepage/partneri/pristroje/mikroskop>>.
- [D-6] Karlova Univerzita [online]. [cit. 2011-04-19]. Fluorescenční mikroskopie. Dostupné z WWW: <<http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/fluorescenci.htm>>.
- [D-7] Univerzita Palackého v Olomouci [online]. 2010 [cit. 2011-04-19]. Konfokální mikroskopie. Dostupné z WWW: <<http://botany.upol.cz/atlas/confmicro/fluorochroms.php>>.

Příloha A - Návod na přípravu kultivačního média

Zásobní roztoky:

| | | |
|----|--|------------|
| 1. | CaCl ₂ 2H ₂ O | 36,800 g/l |
| 2. | MgSO ₄ 7H ₂ O | 37,000 g/l |
| 3. | NaHCO ₃ | 12,600 g/l |
| 4. | K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O | 5,700 g/l |
| 5. | NaNO ₃ | 42,500 g/l |
| 6. | Na ₂ SiO ₃ 5H ₂ O | 21,200 g/l |
| 7. | Na ₂ EDTA | 4,360 g/l |
| | FeCl ₃ 6H ₂ O | 3,150 g/l |
| | CuSO ₄ 5H ₂ O | 0,010 g/l |
| | ZnSO ₄ 7H ₂ O | 0,022 g/l |
| | CoCl ₂ 6H ₂ O | 0,010 g/l |
| | MnCl ₂ 4H ₂ O | 0,180 g/l |
| | Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O | 0,006 g/l |
| | H ₃ BO ₃ | 1,000 g/l |
| 8. | thiamin | 0,100 g/l |
| | biotin | 0,0005 g/l |
| | cyanokobalamin | 0,115 g/l |
| | pufr (Tris) | 0,115 g/l |

Na 1 l média se dává 1 ml zásobního roztoku každé sloučeniny (1–6), 1 ml roztoku mikroprvků (7) a uveden množství práškového pufru. Po autoklávování a zchladnutí se přidá 1 ml směsi vitamínů (8).

Sloučeniny 1 až 7 se musí přidávat do společné nádoby přesně v tomto pořadí, jinak vznikne sraženina [2].

Příloha B - Návod pro cytotoxický test CytoTox 96

Pro vyhodnocování toxicity látky je zapotřebí vytvoření tří vzorků bez testované, potenciálně toxické látky. Prvním vzorkem je živné médium obsahující buňky, pro které je toxicita testována (vzorek A). Z tohoto vzorku je zjištěna spontánní lyze buněk, ke které dochází za normálních okolností. K druhému vzorku, obsahujícímu také médium s buňkami, je přidán lyzační roztok (LYSIS SOLUTION). Přidání tohoto roztoku způsobí lyzi všech buněk ve vzorku, a díky tomuto vzorku je zjištěna maximální koncentrace LDH (vzorek B). Ve třetím vzorku je přítomno pouze živné médium bez buněk, do kterého je přidán lyzační roztok. Tento vzorek slouží k určení pozadí testu (vzorek C). V dalších vzorcích je přítomno kultivační médium s buňkami a testovanými látkami (vzorek D).

Ke vzorkům B a C je přidán lyzační roztok. Objem přidávaného lyzačního roztoku je 10 % z objemu vzorku. Následuje 45 minutová inkubace při laboratorní teplotě. Po inkubaci lyzačního roztoku jsou vzorky A, B, C i D centrifugovány. Rychlost a doba centrifugace je závislá na typu buněk a slouží k oddělení supernatantu od buněčného peletu. Při centrifugaci nesmí být buňky poškozeny. Supernatant je následně přenesen do nových zkumavek a je přidán SUBSTRATE MIX. Tento roztok vznikne napipetováním 12 ml ASSAY BUFFER do zkumavky s práškovou (pevnou) částí SUBSTRATE MIX. Objem roztoku SUBSTRATE MIX je 100 % objemu původního vzorku. V tomto roztoku jsou obsaženy látky, které zapříčiní chemickou reakci LDH a červené zbarvení vzorku. Inkubace probíhá v temnu při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Po inkubaci je ke vzorkům přidán roztok STOP SOLUTION, který zastaví chemickou reakci tetrazoliové soli. Objem přidávaného roztoku je 100 % objemu původního vzorku. Následně jsou vzorky měřeny pomocí UV-VIS spektrofotometru a je odečítána jejich absorbance při 490 nm. Cytotoxicita dané látky je pak vypočítána podle rovnice (14).

Pro minimalizování chyby je vhodné připravovat vzorky a měřit je v duplikátech či triplikátech a pro výpočet cytotoxicity pak využít aritmetické průměry těchto hodnot.

Roztoky LYSIS SOLUTION a STOP SOLUTION je nutné uchovávat při teplotě +4 °C, roztok ASSAY BUFFER a prášková část SUBSTRATE MIX je uchovávána při teplotě -20 °C [29].

Příloha C - Návod pro kalibraci a měření přístrojem

Casy model TT

Pro analyzování životaschopnosti buněk je zapotřebí kalibrace přístroje na příslušnou kulturu. Což znamená nastavení velikostních intervalů, ve kterých se nachází buněčné zbytky, mrtvé buňky (neboli velikost jádra) a živé buňky. Kalibrace jsou různé pro jednotlivé kultury mikroorganismů a mohou se mírně měnit v závislosti na stáří kultury.

Po zapnutí přístroje probíhá kontrola hardwaru, tlakového systému a paměťový test uložených programů, kalibrací a nastavení. V případě, že nejsou detekovány poruchy či problémy, je přístroj připraven k měření a na grafickém displeji je zobrazen prázdný výsledkový graf.

Měření je prováděno pomocí jedné ze tří kapilár s různou velikostí póru. Jejich velikost, rozsah měření a modelové organismy pro kapiláry jsou uvedeny v tabulce 6-4.1. Kapiláru je nutné před výměnou a po ní důkladně vyčistit od zbytků měřených vzorků. K tomu je určený roztok CASY CLEAN, což je bezbarvý, netoxický, nehořlavý a alkalický roztok. Po výměně kapiláry je nutné přenastavení programu na příslušnou kapiláru. Kapiláry jsou uchovávány ve fyziologickém roztoku, který zabraňuje vysušení kapilár a tím jejich poškození.

Tabulka C-1: Vlastnosti kapilár

| kapilára | rozsah měření | typové vzorky |
|----------|---------------|--|
| 45 µm | 0,7–30 µm | bakterie, malé houby |
| 60 µm | 1,2–40 µm | kvasinky, řasy, plankton, krevní buňky a paraziti |
| 150 µm | 3,2–120 µm | savčí buňky, buněčné linie, velký plankton, prvoci |

Po výměně kapiláry je zapotřebí instalace externí elektrody, která snímá generované proudové pole. Elektroda musí být ve svislé poloze, aby byl zajištěn správný příjem signálu. Při měření musí být elektroda zakryta ochranným štítem pro zabránění vnějšího rušení. Při výměně kapiláry a v době, kdy nejsou měřeny vzorky je elektroda uchovávána v silikonovém pouzdře, které zabraňuje jejímu poškození.

Před kalibrací a měřením je nutné provést kontrolu pozadí, které ovlivňuje výsledky měření. Kontrola se provádí v čistém roztoku CASY TON v přednastaveném výchozím programu 00 a je při ní zjišťováno množství přítomných částic, které velikostí

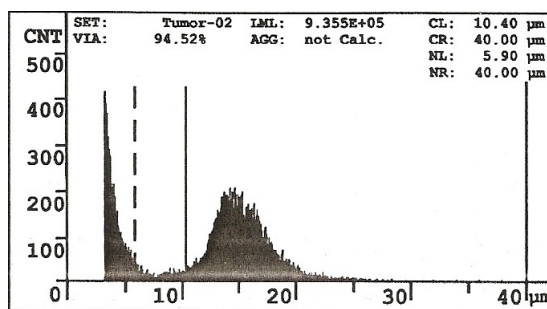
odpovídají obvykle buněčným zbytkům. Maximální přípustné koncentrace částic pro jednotlivé kapiláry jsou uvedeny v tabulce 6-4.2. V případě, že je koncentrace částic vyšší než je jejich limit, je nutné kapiláru vyčistit. Kontrolu pozadí je vhodné provádět i během měření, aby nedošlo ke zkreslení výsledků.

Tabulka C-2: Maximální limit pozadí

| kapilára | maximální počet částic |
|-------------------|------------------------|
| 45 μm | < 100 částic/ml |
| 60 μm | < 200 částic/ml |
| 150 μm | < 3 000 částic/ml |

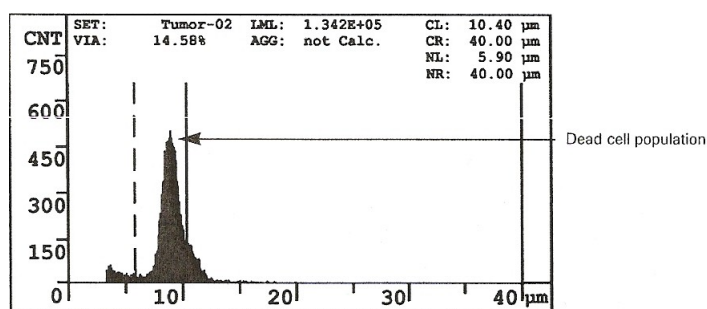
Pro každou kapiláru je možno nastavit 20 různých programů, z čehož je jeden přednastavený pro kontrolu pozadí a není vhodné jej měnit. Jednotlivé programy jsou očíslované a je možné je pojmenovat pro jejich lepší identifikaci. V programech lze nadefinovat maximální hodnotu osy X (velikost měřených vzorků), dále pak objem měřeného vzorku, počet cyklů měření, velikost zobrazované osy Y (počet částic ve vzorku) a polohu vyhodnocovacích a normalizačních kurzorů. Velikost osy X určuje množství částic, které jsou vyhodnocovány, velikost osy Y ovlivňuje pouze zobrazení distribučního rozložení (graf), nikoli vyhodnocování.

Před samotným měřením je nutná kalibrace kultury, při níž je nastavena hodnota vyhodnocovacího a normalizačního kurzoru. Mezi levým (NL) a pravým (NR) normalizačním kurzorem jsou obsaženy živé i mrtvé buňky kultury, mezi levým (CL) a (CR) pravým vyhodnocovacím kurzorem se nachází pouze živé buňky v kultuře viz. obr. C-1. Pro kalibraci je nutné použít kulturu, která se nachází v exponenciální fázi růstu, která obsahuje více než 90 % živých buněk. Při kalibraci jsou nežádoucí buněčné agregáty, které se mohou v kultuře vyskytovat. Je nutné tyto shluky buněk před měřením odstranit. Obvykle stačí kulturu promíchat například pomocí vortexu.



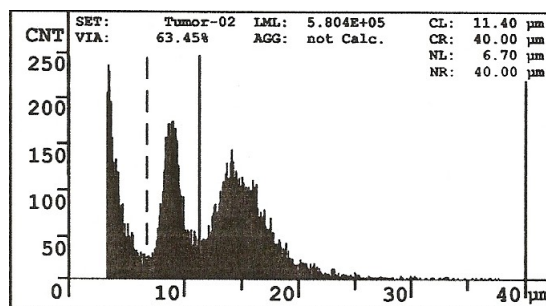
Obr. C-1: Kalibrace - výsledky vzorku se živými buňkami; [30]

Přístroj se pro jednotlivé buněčné kultury kalibruje pomocí tří vzorků. Nejprve je vytvořen vzorek se živou kulturou. V závislosti na počtu buněk v kultuře je do kyvety napipetováno 20–200 μl vzorku kultury. Následně je přidáno 10 ml roztoku CASY TON a vzorek je promíchán trojnásobným otočením kyvety o 180° . Poté je vzorek změřen. Hodnota levého normalizačního kurzoru je nastavena k pravému okraji píku buněčných zbytků a hodnota levého vyhodnocovacího kurzoru je nastavena k levému okraji píku živých buněk. Pravé kurzory jsou nastaveny na maximální hodnotu rozsahu osy x viz obr. C-1. Poté je připraven vzorek s uměle usmrcenými buňkami pomocí CASY BLUE. Do nové kyvety je napipetován stejný objem vzorku kultury jako při prvním měření. Následně je přidáno 800 μl roztoku CASY BLUE a vzorek je promíchán pětinasobným nasáním vzorku pipetou. Následuje 2 minutová inkubace při laboratorní teplotě, po které je vzorek naředěn 9 ml roztoku CASY TON a je promíchán trojnásobným otočením kyvety o 180° . Po naředění vzorku je nutné počkat 1 minutu. Následně je vzorek ještě jednou promíchán a změřen. Na zobrazeném grafu by měl pík mrtvých buněk ležet mezi levým normalizačním a levým vyhodnocovacím kurzorem viz obr. C-2.



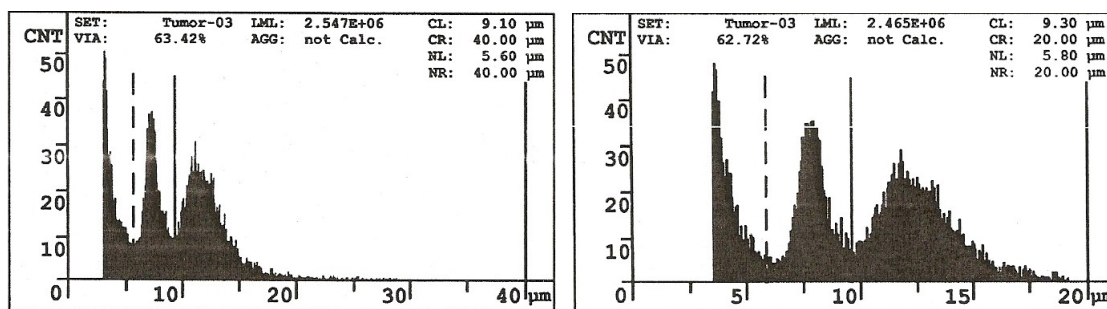
Obr. C-2: Kalibrace - výsledky vzorku s mrtvými buňkami; [30]

Poslední vzorek obsahuje živé i mrtvé buňky. Již připravené a změřené vzorky jsou znovu promíchány a do nové kyvety je napipetováno 7 ml vzorku živých buněk a 3 ml vzorku mrtvých buněk. Poté je kyveta se vzorkem promíchána trojnásobným otočením kyvety o 180° a vzorek je změřen. Na výsledném grafu jsou zobrazené buněčné zbytky, mrtvé a živé buňky. Při zobrazení všech tří píků je možné jemné doladění pozic kurzorů, které by měly ležet v minimu mezi dvěma píky viz obr. C-3.



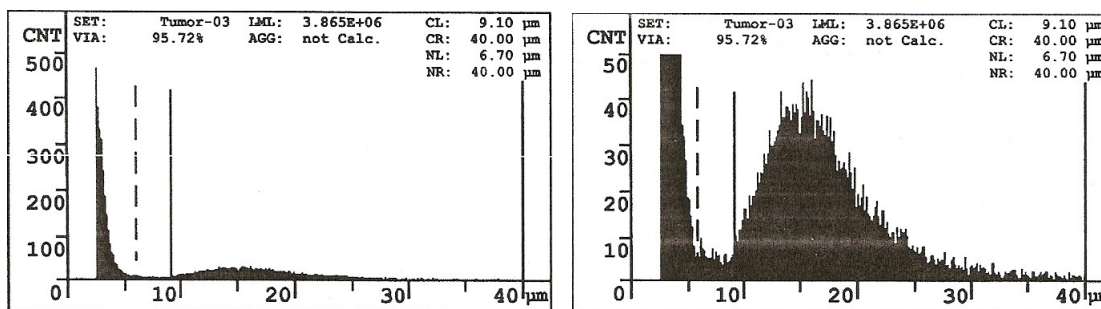
Obr. C-3: Kalibrace - výsledky vzorku se živými a mrtvými buňkami; [30]

V případě, že píky leží blízko u sebe, je možné pro přesné zkalibrování zúžení měřicího rozsahu. V programu je pro osu x vybrána menší hodnota, čímž dojde k optickému rozšíření velikostního rozložení obr. C-4. Při změně rozsahu měření jsou data z posledního měřeného vzorku smazána. Proto je nutné vzorek s živými a mrtvými buňkami změřit znovu.



Obr. C-4: Optimalizace - zúžení osy x; [30]

Pokud je velikostní rozložení příliš ploché, což bývá způsobeno mnohonásobně větším množstvím buněčných zbytků, je možno "přiblížit" graf. Toto přiblížení je umožněno změnou rozsahu osy y (počet částic), po které jsou píky lépe identifikovatelné obr. C-5. Změna rozsahu osy y zasahuje pouze do grafického vyjádření naměřených hodnot, a proto není nutné po změně rozsahu znovu vzorek měřit. Pro vlastní měření je však vhodné zvětšit objem měřeného vzorku či zvýšit počet cyklů měření. Při více cyklech měření nedochází k průměrování naměřených hodnot jednotlivých měření, nýbrž k jejich sečtení. Počet měření ani objem měřeného vzorku nijak neovlivňuje velikostní rozložení měřeného vzorku ani procentuální vyjádření životaschopnosti buněk.



Obr. C-5: Optimalizace - „zoom“; [30]

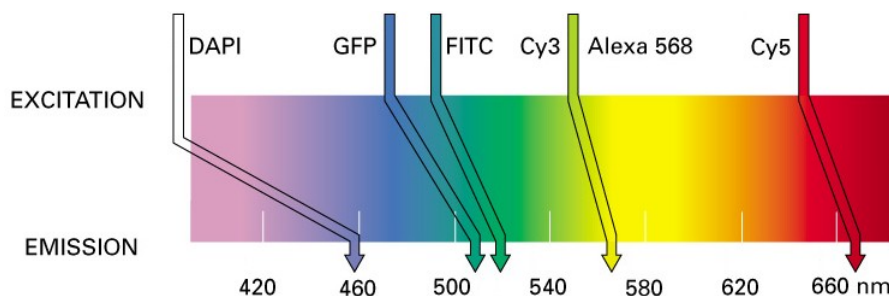
Pokud byl při kalibraci zmenšen měřicí rozsah, je nezbytné jej po zkalibrování nastavit na maximální hodnotu. Jinak by při vlastním měření nebyly vyhodnocovány buněčné shluky, které by byly větší než měřicí rozsah.

Před samotným měřením je důležitá kontrola, zda je v softwaru nastavená stejná kapilára, která se právě používá, kontrola pozadí měření a volba správného měřícího programu. Vzorky určené pro měření procentuálního vyjádření životaschopnosti se připravují obdobně jako při kalibraci. V závislosti na počtu buněk v kultuře je do kyvety napipetováno 20–200 µl a 10 ml roztoku CASY TON. Vzorek je promíchán trojnásobným otočením kyvety o 180° a následně je změřen. Výsledky měření jsou zobrazeny na grafickém displeji. Pro další práci a vyhodnocování je nutné naměřená data přepsat či vyfotografovat, protože při měření dalšího vzorku jsou přepsána novými výsledky. Mezi jednotlivými měřeními musí být kapilára očištěna pomocí kyvety s čistým roztokem CASY TON.

V průběhu kalibrace nebo měření se kapilára může ucpat nebo může dojít k vniknutí vzduchové bubliny do kapiláry. V těchto situacích je měření zastaveno a je nezbytné provést čištění kapiláry pomocí roztoku CASY TON. Pokud problém přetrvává i po několika násobném čištění (tříkrát), je možné k čištění použít roztok CASY CLEAN. Po ukončení měření je důležité přístroj třikrát pročistit roztokem CASY CLEAN, aby byly odstraněny veškeré zbytky vzorků, které by se mohly v přístroji vyskytovat. Poté je možné přístroj vypnout.

Příloha D - Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je založena na jevu zvaném fluorescence. Tento jev využívá chování některých látek absorbovat světlo určité vlnové délky a emitovat světlo jiné vlnové délky. Umožňuje tak zobrazovat látky obsažené například v buňkách v minimálním množství. Je rozlišována primární a sekundární fluorescence. Při primární fluorescenci je v preparátu přirozeně přítomná látka, která po ozáření dokáže sama emitovat světlo odlišné vlnové délky. Jednou z takových látek je například chlorofyl přítomný v sinicích a řasách, který po ozáření modrým světlem emituje světlo červené. Při sekundární fluorescenci je ke zkoumanému preparátu bez vlastní fluorescence přidána fluorescenční látka zvaná fluorochrom nebo fluorofor, která se naváže na specifickou buněčnou složku nebo molekulu. Fluorochrom po ozáření emituje světlo příslušné vlnové délky. Existuje velké množství fluorochromů například GFP, FITC, primulin, hoechst, ethidium bromid, propidium jodid, akridinová oranž nebo congo red, které jsou excitovány a emitují světlo různých vlnových délek viz obr D-1.

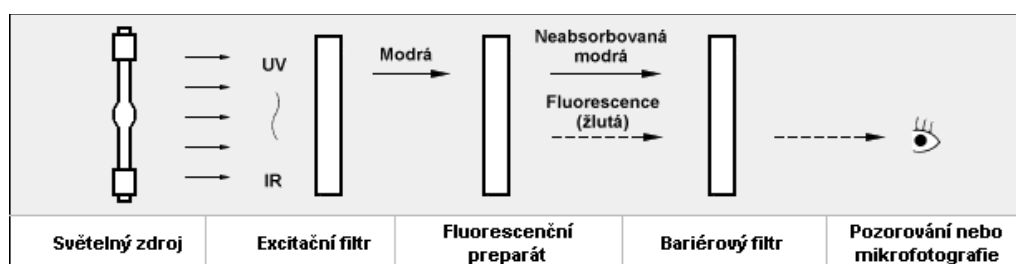


Obr. D-1: Příklady některých fluorochromů s příslušnými excitačními a emisními vlnovými délkami; [D-1]

Při fluorescenci dochází k intermolekulární přeměně energie. Fluorochrom je excitován elektromagnetickým zářením o vhodné vlnové délce a dochází k absorpci fotonů. Molekuly fluorochromu přecházejí ze základního elektronového stavu do excitovaného stavu. V tomto stavu však zůstávají velmi krátkou dobu (10^{-8} – 10^{-5} s), neboť je nestabilní a molekuly klesají zpět na nižší energetické hladiny. Část získané energie je přenesena na kinetickou energii, kterou molekula předá okolí ve formě tepla. Zbylá energie je vyzářena v podobě fotonu a molekula přechází zpět do základního stavu [D-2]. Jako fluorescenční barviva jsou proto používány molekuly, které lze snadno a koordinovaně excitovat a které se rychle vrací zpět na původní hladiny.

Vlnová délka excitovaného elektromagnetického záření je menší než vlnová délka emitovaného záření. Ztráta energie je způsobená přenosem energie do vibračních pohybů molekul. Intenzita fluorescence je úměrná intenzitě excitačního světla E_{ex} , hustotě fluorochromu ve vzorku a efektivnosti fluorescence respektive kvantovému výtěžku κ . Emitované světlo je vyzařováno všemi směry bez ohledu na směr excitačního světla.

Fluorescenční mikroskop se skládá ze světelného zdroje, excitačního filtru a bariérového filtru jak je vidět na obrázku D-2.



Obr. D-2: Schéma základních součástí fluorescenčního mikroskopu; [D-3]

Ze světelného zdroje vychází světlo o různých vlnových délkách od ultrafialové po infračervenou. Toto světlo prochází přes excitační filtr, který propouští pouze světlo příslušné vlnové délky potřebné pro fluorescenci vzorku. Světlo ostatních vlnových délek je pohlceno. Ve vzorku, na který dopadá světlo jedné vlnové délky, dochází k vyzáření světla o jiné vlnové délce λ_{em} . Neabsorbované excitační světlo a emitované světlo pak prochází přes bariérový filtr, který propouští pouze světlo o vlnové délce λ_{em} . Výsledkem jsou struktury barevně zářící v temném poli.

Volba vlnové délky excitačního a emitovaného záření je velmi podstatná, a proto je důležitá volba vhodných optických filtrů. Ve fluorescenčním mikroskopu se používají buď filtry z barevného skla nebo interferenční filtry. Filtry z barevného skla jsou vyráběny přidáním určitého pigmentu do skla. Přidaný pigment způsobuje absorpci světla a filtry jsou propustné pouze pro část světelného spektra. Oproti interferenčním filtrům jsou levné, ale nelze je použít pro úzké pásmo vlnových délek. Výhodou interferenčních filtrů je naopak velmi ostrá frekvenční charakteristika, které nelze dosáhnout pomocí barevných filtrů. Dále je pak vhodné, aby filtry měly vysokou účinnost přenosu. Zvýšení účinnosti přenosu lze dosáhnout aplikací antireflexních vrstev [D-4].

Fluorescenční mikroskopie se využívá k vizualizaci buněčných jader, chromozomů či cytoskeletu. Dále se využívá v imunodiagnostice k detekci různých antigenů a proteinů [D-5]. Ke zkoumanému vzorku je možné přidat více fluorochromů emitujících světlo různých vlnových délek a následně lze zjišťovat interakci mezi látkami na které jsou fluorochromy navázány.

Nevýhodou klasického fluorescenčního mikroskopu je skutečnost, že do objektivu přichází emitované světlo z roviny nad zaostřenou rovinou a pod ní, což způsobuje rozmazání obrazu. Toto rozmazání je možné odstranit použitím konfokálního fluorescenčního mikroskopu [D-6], [D-7]. Druhou nevýhodou je blednutí (photo-bleaching) vzorku. Při intenzivním ozáření dochází k nevratným změnám ve fluorochromu a ten trvale ztrácí schopnost emitovat záření a dochází až k úplnému vyblednutí. Další nevýhodou je skutečnost, že při přechodu excitovaných molekul na nižší energetické hladiny je uvolňována energie v podobě tepla a dochází k vysychání vodného preparátu a jeho znehodnocení.

Příloha E - Návod pro fluorescenční test Total ROS Detection

Před nasazením experimentů je nutné vytvořit zásobní roztoky, které se dále aplikují ke zkoumaným vzorkům. Wash Buffer Salts je rozpuštěn v 1 l demineralizované vody a je uchováván v chladničce. K Oxidative Stress Detection Reagent je přidáno 60 μ l DMF. Tímto naředěním vznikne 5 mM zásobní roztok. Pro vytvoření ROS Detection Solution jsou do 10 ml Wash Buffer Salts napipetovány 2 μ l Oxidative Stress Detection Reagent a roztok je jemně promíchán. Tento roztok je uchováván v chladničce. Zásobní roztok Oxidative Stress Detection Reagent je uchováván při -20°C . Aby při opětovném rozmrazování nedocházelo k degradaci účinné složky, byly 2 μ l roztoku napipetovány do 10 ml zkumavek. Ty byly uzavřeny víčkem, zaizolovány parafilmem a zamrazeny. ROS Inducer je rozpuštěn ve 100 μ l DMF. Naředěním vznikne 10 mM zásobní roztok. Po přidání 123 μ l demineralizované vody k ROS Inhibitor vznikne 0,5 M zásobní roztok. Tyto roztoky jsou následně přidávány ke zkoumaným vzorkům.

Při experimentech by se měly používat kultury v exponenciální fázi růstu. Hustota buněk by neměla přesáhnout 1 000 000 buněk/ml. Celý pokus by se měl provádět v šeru nebo při nízké intenzitě světla.

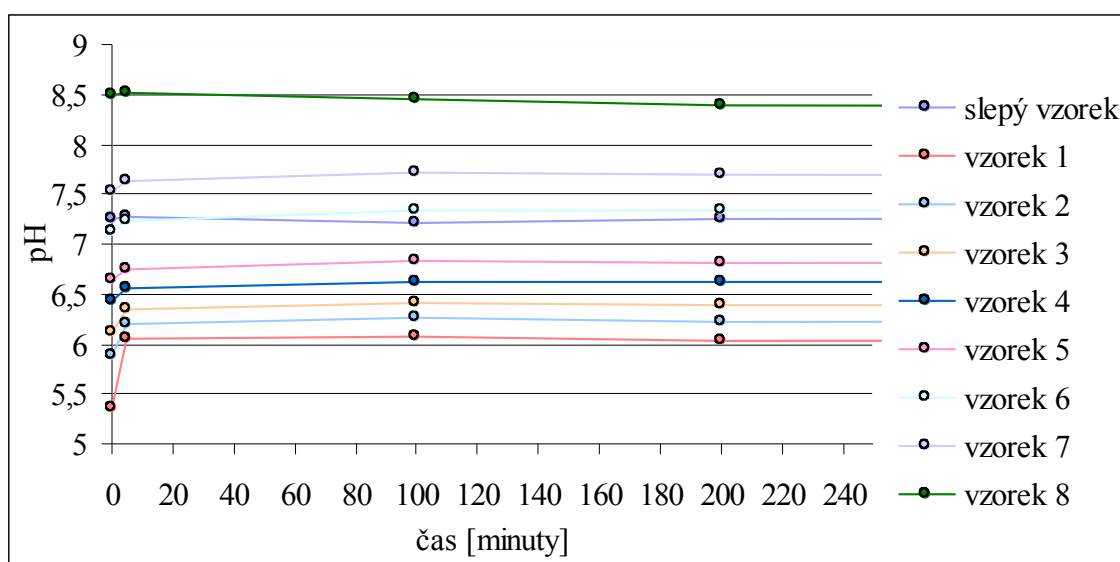
Do centrifugačních zkumavek je napipetován takový objem testované kultury, aby po centrifugaci bylo v buněčném peletu přítomno 100 000 buněk. Vzorky se centrifugují při 1 900 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. Po centrifugaci je ze vzorků odlit supernatant a buněčný pelet je resuspendován 200 μ l ROS Detection Solution. Vzorky jsou inkubovány v temnu po dobu jedné hodiny s opakovaným promícháním. Po 30 minutách inkubace je do vzorků negativní kontroly přidán ROS Inhibitor. Jeho výsledná koncentrace ve vzorku by se měla být 5 mM. Vzorky jsou po ukončení inkubace centrifugovány a je odlit supernatant. Buněčný pelet je resuspendován 5 ml Wash Buffer Salts nebo kultivačního média. Následuje opětovná centrifugace a odlití supernatantu. Tímto způsobem je ze vzorků odstraněn ROS Detection Solution. Ke vzorkům pozitivní kontroly je přidán ROS Inducer, jeho koncentrace ve vzorku by se mohla pohybovat mezi 200–500 μ M a doba inkubace závisí na typu a přesné koncentraci buněčné kultury. Po inkubaci jsou vzorky centrifugovány a je odlit supernatant. Následně je buněčný pelet resuspendován 5 ml Wash Buffer Salts nebo kultivačního média, znovu centrifugován a supernatant je opět odlit. Buněčný pelet

všech vzorků je resuspendován 100 μ l Wash Buffer Salts nebo kultivačního média, a následně je 20 μ l vzorku napipetováno na podložní sklíčko. Takovýto vzorek by měl obsahovat 20 000 buněk. Na fluorescenčním mikroskopu je pozorována fluorescence buněk se zvýšeným množstvím ROS při excitaci 490 nm a emisi 525 nm. Je důležité, aby preparát nevysychal, jinak by byla ovlivněna fluorescence [31].

Příloha F - Výsledky cytotoxických testů

Tabulka F-1: Průměrné hodnoty absorbancí naměřených při prvním testu

| <i>Chlamydomonas</i> sp. | označení | absorbance |
|---|----------|------------|
| médium s buňkami | 14 A | 0,0565 |
| médium s buňkami a s lyzačním roztokem | 14 B | 0,0695 |
| médium bez buněk s lyzačním roztokem | 14 C | 0,0490 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem | 14 D | 0,0605 |
| <i>Anabaena planktonica</i> | | |
| médium s buňkami | 20 A | 0,0530 |
| médium s buňkami a s lyzačním roztokem | 20 B | 0,0400 |
| médium bez buněk s lyzačním roztokem | 20 C | 0,0515 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem | 20 D | 0,0650 |



Graf F-1: Vývoj pH ve vzorcích suspenze nanoželeza s přidavkem pufru

Tabulka F-2: Průměrné hodnoty absorbancí naměřených při druhém testu

| | označení | absorbance |
|--|----------|------------|
| médium bez buněk s lyzačním roztokem | C | 0,0450 |
| <i>Chlamydomonas sp.</i> | | |
| médium s buňkami | 14 A | 0,0795 |
| médium s buňkami a s lyzačním roztokem | 14 B | 0,1105 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem | 14 D | 0,0905 |
| médium s buňkami inkubovanými kyselinou citrónovou | 14 D Ci | 0,0950 |
| médium s buňkami inkubovanými kyselinou sírovou | 14 D Si | 0,0935 |
| <i>Anabaena planktonica</i> | | |
| médium s buňkami | 20 A | 0,0755 |
| médium s buňkami a s lyzačním roztokem | 20 B | 0,0945 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem | 20 D | 0,0735 |
| médium s buňkami inkubovanými kyselinou citrónovou | 20 D Ci | 0,0920 |
| médium s buňkami inkubovanými kyselinou sírovou | 20 D Si | 0,0920 |
| médium s buňkami inkubovanými kyselinou octovou | 20 D Oc | 0,0815 |

Tabulka F-3: Průměrné hodnoty absorbancí naměřených při třetím testu

| | označení | absorbance |
|--|------------|------------|
| médium bez buněk s lyzačním roztokem | C | 0,1570 |
| <i>Chlamydomonas sp.</i> | | |
| médium s buňkami | 14 A | 0,4880 |
| médium s buňkami a s lyzačním roztokem | 14 B | 0,3170 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem 50 mg/l | 14 D 50 | 0,0920 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem 100 mg/l | 14 D 100 | 0,0975 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem 500 mg/l | 14 D 500 | 0,1575 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem 1 000 mg/l | 14 D 1 000 | 0,3075 |
| <i>Anabaena planktonica</i> | | |
| médium s buňkami | A 20 | 0,6150 |
| médium s buňkami a s lyzačním roztokem | B 20 | 0,3610 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem 500 mg/l | 20 D 500 | 0,1600 |

Tabulka F-4: Průměrné hodnoty absorbancí naměřených při čtvrtém testu (první etapa)

| | označení | absorbance |
|--|------------|------------|
| médium bez buněk s lyzačním roztokem | C | 0,0640 |
| <i>Chlamydomonas sp.</i> | | |
| médium s buňkami | 14 A | 0,0845 |
| médium s buňkami a s lyzačním roztokem | 14 B | 0,2195 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem 500 mg/l | 14 D 500 | 0,1310 |
| <i>Anabaena planktonica</i> | | |
| médium s buňkami | 20 A | 0,0740 |
| médium s buňkami a s lyzačním roztokem | 20 B | 0,1130 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem 100 mg/l | 20 D 100 | 0,0750 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem 250 mg/l | 20 D 250 | 0,0825 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem 500 mg/l | 20 D 500 | 0,0880 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem 750 mg/l | 20 D 750 | 0,1025 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem 1 000 mg/l | 20 D 1 000 | 0,0970 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem 1 500 mg/l | 20 D 1 500 | 0,0940 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem 2 000 mg/l | 20 D 2 000 | 0,0890 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem 2 500 mg/l | 20 D 2 500 | 0,0860 |

Tabulka F-5: Průměrné hodnoty absorbancí naměřených
při čtvrtém testu (druhá etapa)

| | označení | absorbance |
|--|------------|------------|
| médium bez buněk s lyzačním roztokem | C | 0,0640 |
| <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> | | |
| médium s buňkami | 21 A | 0,0735 |
| médium s buňkami a s lyzačním roztokem | 21 B | 0,2080 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem 100 mg/l | 21 D 100 | 0,0790 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem 250 mg/l | 21 D 250 | 0,0845 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem 500 mg/l | 21 D 500 | 0,1110 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem 750 mg/l | 21 D 750 | 0,1310 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem 1 000 mg/l | 21 D 1 000 | 0,1605 |
| médium s buňkami inkubovanými nanoželezem 1 500 mg/l | 21 D 1 500 | 0,1480 |